Vol. IV — Ottobre 1932 - A. X — Fasc. X

SOCIETÀ INTERNAZIONALE DI MICROBIOLOGIA

BOLLETTINO

DELLA

SEZIONE ITALIANA

SOMMAIRE

SOCIETÀ INTERNAZIONALE DI MICROBIOLOGIA

SEZIONE ITALIANA

Segue ELENCO DEGLI ADERENTI.

344. – Toffoletto dott. Ettore - Via Monte Grappa 13, *Bologna*.
345. – Borasio dott. Giuseppe - R. Stazione di Risicultura, *Vercelli*.
346. – Giannone prof. Liborio, - *Caltanissetta*.
347. – Taccone prof. Gerolamo - Via Cappellari 4, *Milano*.
348. – Di Micheli dott. Giovanni - Piazzale del Re, *Firenze*.
349. – Zavattari prof. Edoardo - Istituto di Fisiologia ed Anatomia Comparata, *Pavia*.

COMUNICAZIONE AI SOCI

In occasione del IV° Congresso della Sezione Italiana della Società Internazionale di Microbiologia è stato deliberato di tenere nel 1934 il V° Congresso, per dare ai relatori ed ai soci un maggior lasso di tempo per la preparazione dei lavori.

S'invitano pertanto i soci a voler indicare i temi di relazione da essi preferiti, per dar modo alla Presidenza di scegliere nel modo maggiormente proficuo gli argomenti da trattare. Si ricorda che i temi di relazione sono tre: uno di microbiologia agraria o di patologia vegetale, uno di microbiologia o parassitologia animale ed uno d'immunologia, nonchè un argomento all'ordine del giorno che verta su questioni di attualità nel campo della microbiologia in senso lato.

Le proposte di temi debbono essere inviate non oltre il dicembre 1932 ai segretari di redazione proff. G. Dessy e C. Arnaudi e possono contenere eventualmente la designazione del relatore.

La Presidenza vaglierà i temi proposti ed entro il gennaio del prossimo anno farà conoscere il titolo dei temi scelti ed il nome dei relatori.

IV° CONGRESSO NAZIONALE DI MICROBIOLOGIA

Nei giorni 3-4-5 ottobre, come era stato annunziato, ha avuto luogo in Milano, presso l'Istituto Sieroterapico Milanese, il IV° Congresso Nazionale di Microbiologia.

Oltre un centinaio di soci, venuti dalle varie città italiane, parteciparono alle sedute del congresso, che riuscirono oltremodo interessanti.

Hanno partecipato ai nostri lavori anche illustri rappresentanti della scienza estera come il prof. M. Soule, dell'Università di Michigam, il quale presentò un interessante rapporto sulle Dissociazioni batteriche. Inoltre i proff. C. Neuberg, direttore del Kaiser Wilhelm Institut für Biochimie di Berlino; H. Sachs, direttore dell'Institut für Krebsforschung; G. Ramon, dell'Institut Pasteur, tennero rispettivamente conferenze sui seguenti temi:

Le condizioni chimiche ed energetiche nella scissione e trasformazione degli idrati di carbonio per opera di varie cellule e dei loro fermenti.

Un venticinquennio di sierodiagnosi della sifilide.

Essai sur l'immunité antitoxique, la constitution et l'origine des antitoxines.

Il loro testo verrà pubblicato integralmente negli Atti del Congresso.

Il Presidente della nostra Sezione, Prof. S. Belfanti, accolto da vivi applausi inaugurò i lavori del Congresso con la seguente relazione:

Egregi Consoci,

Eccoci al nostro IV° Congresso. Non senza compiacimento, a nome del Comitato Direttivo dell'Associazione, Vi rivolgo un saluto, mentre vi ringrazio sopratutto di non essere mancati alla nostra ormai periodica riunione. Essa costituisce un completamento logico al legame ideale, ma utile e pratico, costituito dal nostro Bollettino. Se questo infatti è il mezzo col quale ci comunichiamo l'esito delle nostre ricerche e le portiamo a conoscenza dei Colleghi stranieri, la nostra annuale Riunione, raggiunge lo scopo di farci incontrare fra noi e di farci conoscere anche i più giovani Colleghi, che ogni anno vengono ad ingrossare la schiera dei microbiologi italiani; lasciate quindi ch'io particolarmente a Loro rivolga un saluto cordiale, che vuole anche essere l'augurio e l'incitamento a quelli che un giorno dovranno essere i continuatori delle tradizioni scientifiche della Patria.

Lo scopo delle brevi parole che Vi rivolgo, dovrebbe essere quello di intrattenervi sulla attività della nostra Sezione. Essa si riassume assai rapida-

mente nella vita del nostro Bollettino. Possiamo compiacerci del suo continuo diffondersi all'estero, donde giungono spesso indubbi segni di favorevole apprezzamento. Solo di uno vi farò cenno, quello cioè contenuto nella circolare del Comitato centrale della Società Internazionale di Microbiologia, il quale incitando le Sezioni nazionali dei vari paesi a provvedersi di un organo che raccolga la produzione microbiologica di ciascuno, pone come esempio imitabile il Bollettino della nostra Società.

Il nostro organo, non ha certo raggiunto però, lo sviluppo e la perfezione che sarebbero desiderabili: lo sviluppo è parecchio al di sotto di quanto potrebbe essere, se tutti i Colleghi Italiani volessero mandarci sotto forma di note preventive, l'esito delle loro ricerche, prima che esse siano poi edite nei numerosissimi giornali italiani, dove vanno spesso sperdute. Circa l'organizzazione del giornale, esso lascia a desiderare specialmente per la qualità del francese *usato e noi siamo i primi a riconoscere questa deficienza, che qualcuno dei soci ci ha fatto rilevare a varie riprese. Il meglio sarebbe invitare i collaboratori ad inviarci le loro note già tradotte in un francese più brillante, o ad indicarci traduttori che alla buona conoscenza della lingua, uniscano però la conoscenza dell'argomento, poichè è assai più importante la esatta traduzione dei concetti scientifici, che la purezza della lingua.*

Un progresso, mi pare sia invece costituito dalla complessità degli argomenti trattati: essi toccano tutti i più importanti problemi della microbiologia, nelle sue diverse branche e provengono dalle diverse Scuole italiane, che quasi al completo hanno aderito e partecipano attivamente alla vita della nostra Sezione. Infatti i nostri soci sono ormai 343, *numero veramente notevole.*

Tra le vicende importanti della nostra Società, dobbiamo ricordare che il II° Congresso Internazionale di Microbiologia, che dovevasi riunire a Berlino nel 1933 *è stato invece rinviato al* 1934. *Circa i temi che dovranno esservi discussi, si stanno ora prendendo accordi con i vari Comitati Nazionali, ed allorquando notizie più esatte saranno a nostra conoscenza, verranno pubblicate sul nostro Bollettino.*

Questo riferimento alla attività internazionale della nostra Società, riporta alla mia mente ed al mio cuore la memoria di uno degli studiosi che più attivamente operarono per il suo sorgere: voglio parlare di Rudolph Kraus, *spentosi improvvisamente a Santiago del Cile poche settimane or sono.*

L'opera di Kraus *come microbiologo e come organizzatore della Società Internazionale di Microbiologia, sono di tale importanza, che ritengo mio dovere ricordarla brevemente a Voi.*

Non appena laureato, subito Egli si dedicò con tutto l'entusiasmo della gioventù, ai problemi della microbiologia e della immunologia. Dopo un corso di studi all'Istituto Pasteur di Parigi, divenne assistente e collabora-

tore di Paltauf nell'Istituto Sieroterapico di Vienna, ove rimase vent'anni. Fu a Vienna che Egli, nel 1897, *scoprì il fenomeno della precipitazione, ne riconobbe la specificità e la portata pratica e pose le basi per la sua utilizzazione della differenziazione dei microrganismi e nella sierodiagnosi delle malattie infettive e sopratutto per quelle delle albumine. Altri contributi pregevoli ebbe da Lui lo sviluppo della sieroterapia, lo studio delle antitossine, la titolazione dei sieri, il problema dell'anafilassi sperimentale, lo studio della sifilide, del cancro, e dei virus filtrabili. Per le Sue vaste conoscenze ed il Suo talento organizzatore, venne chiamato a dirigere gli Istituti Batteriologici e Sieroterapici di Buenos Aires, San Paolo ed ultimamente di Santiago del Cile.*

Nella letteratura microbiologica, il nome di Kraus *occupa uno dei primissimi posti: a Lui si devono alcuni testi classici quali il « Handbuch der mikrobiologischen Technik », in collaborazione con* Uhlenhut *e la terza edizione del « Handbuch der pathogenen Mikroorganismen » in associazione con* Kolle ed Uhlenhut. *Nella sua mente la Microbiologia doveva essere scienza indipendente e non ancella della Patologia, epperò Egli stimolò ed aiutò la fondazione della « Zeitschrift fur Immunitätsforschung » e della « Seuchenbekampfung », riviste ben note ed apprezzate nel nostro campo. Nello stesso intento Egli fondò dapprima la « Deutsche Vereinigung fur Mikrobiologie » e quindi diresse per molti anni la « Wiener Mikrobiologische Gesellschaft ». Senza tema di errare si può dire che è da* Kraus *che partì l'iniziativa per la fondazione della Società Internazionale di Microbiologia e che a Lui spetta il merito di aver fondato a Parigi il primo nucleo di questo legame ideale e fattivo, tra i microbiologi di tutto il mondo. Mi pare giusto pertanto, che i microbiologi italiani, prima di iniziare i loro lavori, mandino alla memoria Sua, l'omaggio devoto che si deve a chi ha servito con onore la Scienza.*

Ed eccoci ai nostri lavori.

Come Voi sapete, quest'anno si sono volute limitare le comunicazioni ai soli temi di relazione: con ciò si è naturalmente alleggerito il numero delle comunicazioni e si dovrebbe rendere più omogenea la discussione.

Questa, dovrebbe venir favorita anche dal fatto che la quasi totalità delle Relazioni e comunicazioni è stata stampata in bozze, che Voi avete ricevuto già da qualche giorno. Il Vostro Comitato direttivo, ritiene che con ciò i nostri lavori debbano riuscire più attivi e più utili al progresso dei nostri studi. I temi di relazioni che vennero prescelti, sono tutti del più alto interesse: desidero fare solo un rilievo particolare su quello che verrà trattato fra pochi istanti dal Prof. Gino de' Rossi. Egli prospetterà un complesso di studi e di questioni microbiologiche, che se hanno una grande importanza teorica per le peculiari proprietà dei germi considerati, hanno altresì un diretto riflesso con la attività economica più importante per la nostra Pa-

tria: l'Agricoltura. Mi sembra cosa bella, oltre che giusta ed utile, che anche nelle nostre riunioni, trovi un'eco l'amore e l'interesse per la terra madre, che l'opera, si può dire personale, del Capo del Governo, ha saputo suscitare in tutti gli italiani.

Sull'importanza e l'interesse degli altri temi trattati da illustri competenti, quali i Proff. Petragnani, Mariani, Allaria e Viola, non occorre che io mi trattenga. Ringrazio invece e vivamente, questi valorosi colleghi, che hanno accolto il nostro invito e sono venuti fra noi dalle varie città d'Italia.

Il Congresso nostro acquista quest'anno un interesse speciale per la cortese collaborazione che tre illustri Colleghi di altre nazioni, hanno voluto assicurarci, venendo fra noi ad esporci con conferenze, i risultati del loro lavoro e della loro esperienza. Ai Proff. Sachs, Neuberg e Ramon, i quali hanno voluto, dietro nostro invito, prendere parte al nostro Congresso con speciali relazioni, porgo il nostro cordiale ringraziamento.

Non posso a questo punto dimenticare che presente con noi è il Prof. Soule venuto dagli Stati Uniti per partecipare ai nostri lavori, la sua presenza è per noi tanto più simpatica in quanto egli rappresenta i Microbiologi dell'America del Nord essendo egli Segretario della Società di Microbiologia Americana. A nome della Sezione Italiana, gli porgo il benvenuto più cordiale.

Il nostro Congresso si riunisce negli stessi giorni nei quali, ricorrendo il X Annuale dell'Era fascista, gli Intellettuali d'Italia si danno convegno in Roma, a riaffermare la fede nel regime. Noi non possiamo restare assenti e prima di iniziare i nostri lavori, mandando un pensiero devoto alla Maestà del Re, inneggiamo all'Uomo che regge i destini della Patria.

Dopo l'applaudito discorso del Prof. Belfanti s'iniziarono i lavori con la relazione del Prof. De Rossi, e proseguirono secondo il programma.

Al termine dell'ultima seduta, in assenza del segretario generale Prof. A. Azzi, il Presidente presentò il seguente bilancio consuntivo del 1931:

ATTIVITÀ.

N. 281 quote sociali a L. 10	L.	2.810,—
N. 51 quote iscrizione III Congresso	»	1.275,—
Incassi per Pubblicità	»	1.500,—
Versate dall'Istituto Sieroterapico Milanese quale concorso maggiori spese	»	73.513,55
Totale entrate	L.	79.098,55

PASSIVITÀ.

Spese di traduzione	L. 10.911,—
Spese di stampa del Bollettino	» 38.148,90
Spese di stampa bozze e atti del Congresso	» 17.681,20
Circolari, stampati, cancelleria	» 3.112,85
Spese Postali	» 9.244,60
Totale spese	L. 79.098,55

Il Bilancio venne approvato per acclamazione.

Circa l'epoca del prossimo Congresso ed i temi di relazione l'assemblea su proposta del Sen. Lustig, deliberò che il V° Congresso Nazionale si riunisse nella primavera del 1934 e che i temi venissero stabiliti dalla Presidenza, su proposta scritta dei soci. A questo proposito si stabilisce che dette proposte debbano pervenire entro il corrente anno e che la Presidenza comunichi il titolo dei temi ed il nome dei relatori scelti, entro il gennaio 1933.

La cronaca dettagliata del Congresso sarà raccolta nel volume degli Atti unitamente al testo delle relazioni, delle comunicazioni ed alla relativa discussione. Nel Bollettino pubblicheremo a partire da questo numero le relazioni e le comunicazioni tradotte in francese e raggruppate entro i limiti del possibile per argomento.

Per ragioni redazionali evidenti, data la notevole mole di materiale da tradurre e stampare, i numeri di ottobre, novembre e dicembre 1932 saranno pubblicati con notevole ritardo.

Con i numeri del prossimo anno la pubblicazione del Bollettino *tornerà regolare.*

A. SPINELLI - **Démonstration de la mise en liberté de substasces type hystamine du poumon isolé du cobaye en choc anaphylactique.**

Parmi les très nombreuses théories qui ont été émises pour expliquer le méccanisme du choc enaphylatique, celles fondées sur l'hypothèse de l'existence d'un poison anaphylactique (théories chimiques) ont toujours joui d'une préférence générale. C'est ainsi que, dès le début des études sur l'anaphylaxie, un grand nombre d'auteurs ont recherché soigneusement si l'on pouvait démontrer l'existence et arriver à identifier cette substance toxique hypothétique, ou poison anaphylactique, qui devrait être mis en liberté au moment du choc consécutif à l'injection déchaînante.

La peptone avait déjà attiré l'attention à cause de l'analogie du choc peptonique avec le choc anaphylactique; mais dès que l'on eut connaissance d'une substance aussi simple que l'hystamine, et dès que l'on vit la grande ressemblance entre le choc provoqué par cette substance et le choc anaphylactique (avec les différences essentielles propres aux différentes espèces animales) on supposa aussitôt que cette substance si toxique et si facilement élaborée pût se dégager au moment de la rencontre dans le sang de l'antigène avec l'anticorps. La théorie ainsi énoncée eut peu de suite. Dale lui même la trouve insoutenable, et pour expliquer l'incontestable affinité entre choc anaphylactique et choc par hystamine il admit hypothétiquement que l'action physico-chimique qui se produit au moment de la rencontre de l'antigène et de l'anticorps à l'intérieur des cellules était de même nature de celle exercée par un poison chimique, type hystamine.

Mais ensuite, grâce surtout aux recherches très précises de Lewis et de Manwaring et ses collaborateurs, ont vit reparaitre l'hypothèse de l'existence d'un vrai poison anaphylactique responsable du choc.

D'après cette théorie, à laquelle Dale aussi s'est associé (*Lancet*, 1929, p. 1285) la réaction entre antigène et anticorps s'achève à l'intérieur d'élements spécifiquement sensibles de certains organes, où elle provoque des altérations indéterminées à la suite desquelles se dégagent des substances de nature inconnue, parmi lesquelles il faut admettre la existence de composés solubles dans l'alcool et ayant les propriétés physiologiques de l'hystamine.

Pour expliquer les grandes différences éxistant dans la symptomathologie du choc anaphylactique dans les différentes espèces animales on a admis que ces substances là ne seraient pas liberées de la même façon dans les mêmes organes. Chez le cobaye, qui représente l'exemple

le plus typique de choc respiratoire, l'organe le plus important à ce point de vue serait le poumon, tandis que chez le chien dominerait le choc du type circulatoire avec congestion du système hépatique et portale par un méccanisme de vasoconstriction des veines hépatiques et de vasodilatation capillaire. C'est pourquoi l'on dit que chez le cobaye et chez le chien (qui sont placés aux deux opposées du cadre symptomathologique) l'organe du choc est respectivement le poumon et le foie. On peut indiquer, par cela même, quel est l'appareil organique qui est le plus intéressé, bien que l'on admette aussi chez le cobaye une certaine participation du foie dans le dégagement de substances capables surtout de diminuir la coagulabilité du sang.

Les contributions expérimentales qui appuieraient d'une façon sérieuse idées sont nombreuses et du plus grand intérêt; elles sont toutes l'expression d'une multitude de travaux, employant des artifices techniques très élégants et des méthodes très délicates.

Manwaring (*Jour. of Immunology*, 1925, X, 59) a soutenu le premier que chez le chien le foie seulement réagit à l'anaphylaxie. En éliminant le foie au moyen d'un ligeture de ses vaisseaux, il ne se produirait plus de choc chez le chien; en outre le sang sortant du foie d'un chien sensibilité et soumis à une injection déchainante de sérum, introduit dans la circulation d'un animal sain produirait chez celui-ci des symptômes de choc, même en employant la circulation croisée.

Une autre contribution importante a été portée par Watanabe grâce aux déterminations quantitatives de substances type hystamine dans le poumon et dans le foie du chien et du cobaye, soit dans des conditions normales, soit à différents degrés de la sensibilisation anaphylactique et après le choc dû à l'injection déchaînante. Dans l'organe du choc du cobaye, c'est-à-dire dans le poumon, le contenu des substances type hystamine est très élevé, environ 10 fois plus que dans le foie du même animal; le 12.me jour après la sensibilisation, le chiffre moyen monte de 14 mgr. par kilogr. de poumon en cas normal, à 73 mgr. et s'abaisse à 3 mgr. après le choc; au contraire on n'a relevé aucune variation pour le foie du cobaye.

Il n'a pas été possible de mettre en évidence chez le chien aucune participation du poumon; tandis que dans le foie (comme il fallait s'y attendre d'après les recherches de Manwaring et d'autres auteurs) les valeurs de substances type hystamine sont, en conditions normales, le double de celles obtenues du poumon, et dans le foie seul on trouve cette augmentation et cette chute qui correspondent respectivement à la période de la sensibilisation et de la déanaphylaxie.

On pourrait croire, d'après cet ensemble de recherches, qu'il serait possible d'en tirer une confirmation exacte des théories chimiques sur

le dégagement des substances à action du type hystamine dans les organes du choc; mais il ne faut tout de même pas oublier que très recemment Watanabe lui-même, en collaboration avec Hosoya (*Zeit f. Immunf.*, 1931, 72, 1-2, p. 57) ont émis quelques doutes à ce sujet, car il parait que 100 jours après la sensibilisation, c'est-à-dire lorsque le cobaye est encore parfaitement en état de réagir avec choc, le contenu des substances à type hystamine du poumon est redevenu presque normal.

Pour conclure nous pouvons affirmer avec Feldberg et Schielf (*Histamin Springer*, Berlin 1930, p. 507) que dans l'anaphylaxie aiguë selon toute vraisemblance, se dégagent de certains groupements cellulaires des substances toxiques à type hystamine. La chose paraît être confirmée soit par la constatation des réactions cutanées caractéristiques d'individus hypersensibles à certaines albumines, réactions superposables à celles provoquées par l'hystamine, soit par la démonstration de l'existence de substances type hystamine qui se dégagent du foie du chien en état de choc et qui peuvent agir à distance chez le même animal ou même être transportées chez des sujets neufs, soit par la constatation de variations du contenu en substances type hystamine des organes de choc du cobaye et du chien.

***

Comme complément de recherches sur ce sujet j'ai essayé de démontrer le dégagement de substances à type hystamine dans le poumon des cobayes en état de choc. Tandis que pour le chien ce problème avait déjà eu une solution complète et affirmative, pour le cobaye au contraire, d'aprés ce que j'ai constaté, on n'à jamais entrepris des recherches de ce genre. Et pourtant, étant donné l'importance capitale que cet animal possède dans l'étude de l'anaphylaxie, cette lacune m'a paru bien regrettable. Je me suis donc proposé, pour éclairer la question, de faire des expériences sur le poumon isolé du cobaye.

On sait avec quelle rapidité l'hystamine disparait de la circulation sanguine (il suffit de rappeler que l'on peut inoculer chez les animaux sensibles des doses plusieurs fois mortelles, pourvu que l'injection soit faite avec une certaine lenteur). Etant donné qu'on n'avait pas encore vérifié si cette disparition résulté d'un méccanisme de neutralisation dans le sang ou de fixation de la part de certain tissus, j'ai cru en tout cas nécessaire de recourir à la perfusion du poumon au moyen de liquides physiologiques. Après un lavage prolongé de l'organe, on faisait arriver au poumon l'antigène qui avait servi de dose mortelle pour un cobaye de poids moyen. Le liquide de perfusion qui était recueilli dans les 10-15 minutes suivant le passage de l'anaphylactogène à travers le poumon

était employé aussitôt pour la recherche de la substance types hystamine. C'est-à-dire que, suivant la pratique plus courante à ce sujet, on recherchait le pouvoir excitant sur la musculature lisse (utérus de cobaye femolle vierge) et le pouvoir hypotensif sur le chat narcotisé et atropinisé.

Il s'agit de recherches plutôt complexes et délicates qui ont nécessité l'emploi d'artifices techniques sur lesquels il m'est impossible de donner ici des détails. Je me borne à rappeler qu'on exécutait la perfusion sur des cobayes d'environ 350 gr. vers le 20.ême jour après la sensibilisation et que j'ai suivi la méthode indiquée par Baehr et Pick.

Le thorax ouvert, on passait une cannule d'afflux dans l'artère pulmonaire et une d'écoulement dans l'aorte; de sorte que le poumon, qui était ventilé lentement, restait à sa place dans la cage thoracique, tout en se conduisant désormais comme un organe isolé. Le liquide de perfusion après 10-15 minutes est complètement pur et ne présente plus aucune trace de sang.

J'ai eu soin d'éliminer autant que possible du liquide obtenu après l'injection déchaînante la plus grande partie du sérum dè cheval qu'on avait employé pour provoquer le choc dans l'organe isolé, et pour plus de sureté j'ai toujours travaillé avec le contrôle d'un animal normal. Les liquides de perfusion qui étaient recueillis après le passage du sérum et qui provenaient soit de l'animal sensibilisé soit de celui de contrôle, étaient amenés de nouveau avec soin au point neutre. On y vérifiait ensuite le pouvoir excitant sur la musculature lisse avec emploi simultané des deux cornes utérines d'un même cobaye vierge normal. L' action hypotensive était éprouvée en injectant dans les veines trois ou cinq centimètres cubes du liquide en question à un jeune chat du poids de 1500-2000 gr. narcotisé avec un mélange chloral-uretan.

Les *conclusions* que je suis autorisé à tirer, d'une première série d'expériences, sont les suivantes:

Chez des cobayes jeunes, 18 jours environ après la sensibilisation par le sérum de cheval, on peut mettre en évidence, à la suite de l'injection déchaînante d'une quantité de sérum égale à la dose mortelle, la mise en liberté par le poumon de substances pas encore chimiquement définies, mais qui sont capables d'exercer un pouvoir excitant sur la musculature lisse du cobaye et une action hypotensive sur la pression arterielle du chat atropinisé. D'après ces propriétés il semble logique d'admettre qu'il s'agisse *vraisemblablement* de substances biologiquement semblables à l'hystamine. Dans le liquide de perfusion du poumon après le choc, ces subsrances peuvont arriver même à une concentration (mesurée d'après leur action biologique) parfois supérieure à celle qu'aurait exercé une solution à 1/50.000 d'hystamine. Je me propose de compléter ces recherches dans

le but de mieux préciser la nature des substances isolables du poumon en état de choc, d'en déterminer le moment d'apparition, et enfin de tâcher de les concentrer et — si possible — de les isoler chimiquement.

Institut de Pathologie Générale de la R. Univ. de Rome.

REITANO UGO et UMBERTO BONCINELLI – **Isolement d'un germe semblable aux Rickettsia, du sang d'une malade atteinte de typhus bénin estival.**

Les hémocultures sur des malades de typhus bénin estival (fièvre exanthématique – fièvre boutonneuse) tentées par de nombreux auteurs et par nous mêmes, ont donné jusqu'à présent des résultats négatifs.

Dans toutes les maladies du groupe du typhus exanthématique qui, comme on sait, embrasse plusieurs tableaux morbides très rapprochés au point de vue clinique et expérimental, il n'a pas été possible d'isoler, en partant du sang des malades, des microrganismes du type des Rickettsias. Les cultures d'autre matériel virulent ont, en général, échoué et, dans quelques cas exceptionnels de premier isolement les cultures secondaires sont restées stériles (Sikora, Weil, Kukzinsky, Noguchi etc.). Nöller aurait obtenu de véritables cultures d'une Rickettsia du pou des brebis (*Rickettsia melophagi*) en gélose glucosée-sang.

De bons résultats ont été décrits par la méthode des cultures des tissus « in vitro » (Wolbach et Schlesinger, Sato etc.).

Nous croyons pourtant qu'il ne soit pas dépourvu d'interêt de relater une observation qui pourrait être le point de départ pour d'autres recherches semblables. Dans les premiers jours de Septembre M. le prof. Vernoni visita une dame agée d'environ 60 ans qui présentait un tableau typique et grave de fièvre exanthématique. La malade était en 9ème journée de maladie – fièvre à 39° – état d'engourdissement et d'assoupissement-exanthème maculo-papuleux géneralisé sur tout le corps, avec tendance aux pétéchies.

Cette dame avait l'habitude de dormir avec un petit chien qui n'était jamais sorti de la maison et du jardin qui l'entourait; le chien avait été soigneusement desinfesté des nombreuses tiques qui le parasitaient mais — au moment de la visite — on a pu en trouver encore une.

Deux ans auparavant la femme de chambre de la malade avait été atteinte par une maladie très semblable à celle actuelle de la vieille dame.

Dans la région interscapulaire de la malade on voyait encore une tache hémorragique qu'il était très naturel de considérer comme la « tache noir » de Piéri et Brugeas.

Quelque centimètres cubes de sang furent prélevés et melangés à une solution citratée à 5%, ensuite on ensemença, dans la proportion de cent. cub. 1 et 1 ½ par tube, trois tubes d'un milieu proposé par M. le prof. Vernoni et qui avait donné de très bons résultats dans la culture d'un spirochète de la chèvre (gélose glucosée + cerveau de rat + quelque cent. cubes de liquide d'ascite). Le milieu de culture était resté une semaine à l'étuve à 37° et était demeuré parfaitement stérile. On avait institué toutefois des tubes de contrôle. Après 6, 9, 14 jours à partir de l'ensemencement tous les tubes étaient toujours stériles. La 16.ème journée, dans deux da ces tubes, on observe un léger trouble qui, en partant du fond du tube, arrive à peu près jusqu'à la moitié du liquide ascitique qui recouvre le milieu. La 18.ème journée, on voit nettement la formation d'un très mince voile sur les 2/3 de la surface de la gélose. Les frottis colorés au Giemsa et au Gram montrent un microbe qui est décoloré par le Gram et qui avec le Giemsa prend une teinte rouge violette. La morphologie de ce microorganisme est variable: les formes en haltères sont très nombreuses avec les extrémites de teinte foncée: il y a aussi des formes en lancettes, en petite chaîne, en diplocoques. D'autres élements offrent l'aspect de minces bâtonnets à bouts arrondis. Les formes plus typiques en haltères ont les dimensions de fractions de micron de largeur et d'un micron à peu près de longueur. A l'observation au paraboloïde, le microrganisme prends l'aspect d'un diplococque allongé, doué de vifs mouvements Browniens. *Toutes ces formes se présentent avec l'aspect caractéristique du type Rickettsia.*

Avec quelques gouttes d'ascite très riche en germes, on ensemence deux tubes du même milieu et un tube de bouillon (1ère subculture). On injecte aussi 0,10 cent. cub, par voie intradermique, au cobaye 51 et 1 ½ cent. cub. à un malade mental.

Après 4 jours d'incubation à l'étuve à 37°, tandis que les tubes de contrôle démeuraient toujours stériles, dans les deux tubes de milieu cerveau-ascite on observe un léger trouble et le mince voil en tout semblable à la culture initiale. Le germe richement développé possède les mêmes caractères observés dans la première culture.

On passe à la seconde subculture en ensemençant deux autres tubes gélose + cerveau + ascite, un tube de gélose glucosée, un tube de gélose glucosée + ascite, et deux de bouillon, dont un en anaérobiose. On injecte 0,05 cc. de culture par voie subdurale aux cobayes 53 et 54, au rat 30 et au lapin 8B2 dans la chambre anterieure de l'oeil gauche.

Après 48 h. de séjour à l'étuve on observe un riche développement du germe dans les deux tubes de gélose + cerveau + ascite, tandis que les autre milieux de culture n'ont montré aucun développement du germe ensemencé.

On injecte au cobaye 55 par voie endopéritonéale 2 cc. de culture et on prépare la troisième subculture en ensemençant aussi des tubes de gélose sang + ascite, de gélose + foie + ascite, gélose glucosée, bouillon-sang, bouillon-ascite. À part deux tubes contaminés, l'observation répétée pendant 18 jours n'a pas permis de mettre en évidence aucun développement ulterieur du germe. Aux tubes de gélose + cerveau + ascite on ajoute une goutte de sang humain défibriné. Cette tentative et d'autres encore faites en répétant les subcultures dans des milieux tout à fait frais n'ont pas donné des résultats.

Le malade inoculé n'a présenté aucun symptôme d'infection; la température observée 4 fois par jour pendant deux semaines est restée normale.

Le cobaye 51 n'a pas eu d'elévation thermique; les cobayes 53 et 54, après quelques élévations thermiques dans les deux premiers jours suivant l'injection, n'ont pas montré des symptômes morbides. Le cobaye 54, sacrifié la 10ème journée présentait une petite quantité de liquide séro-hématique dans la cavité péritonéale, une hypérémie de l'utérus et du péritoine pariétal: rien à l'examen macroscopique du cerveau. Les frottis du liquide péritonéal et du péritoine n'ont pas démontré la présence du germe; les exames en culture sont restés négatifs.

Le cobaye 53 sacrifié la 12.ème journée, à l'autopsie, ne présentait rien de particulier. On injecte toutefois le broyage de son cerveau à un malade mental (encore en observation). L'examen du rat 30 sacrifié la 14ème journée est négatif. Dans le lapin 8 B_2, le jour après l'inoculation on observa une déformation de l'iris, une légère opacité cornéenne qui disparut rapidement.

Les observations que nous venons de relater, et qu'il faut rattacher aux études expérimentales sur la fièvre exanthématique que nous poursuivons (v. *Policlinico, sez. Pratica,* N° 36, 1932 - *Communicat. au 1èr Congrès d'Hygiène Médit.*, Marseille, Sept. 1932) permettent de faire quelques considérations:

En excluant l'hypothèse que le germe isolé en culture pure soit dérivé du cerveau de rat – un des constituants du milieu cultural – parce que les tubes de contrôle sont demeurés tout à fait steriles, ont est porté à croire que le microorganisme existait dans le sang de la malade atteint de fièvre exanthématique.

Par la morphologie, les proprietés de coloration, les exigences culturales, l'épuisement dans les milieux de culture au 3ème passage, nous formulons l'hypothèse qu'il s'agit d'un germe très semblable aux Rickettias. Il faut noter que nous avons observé des microrganismes identiques au point de vue morphologique, dans le corps des tiques (*Rhipicephalus sanguineus*) et dans le péritoine pariétal de la vaginale du

testicule de cobayes inoculés par voie intrapéritonéale avec le produit de broyage des tiques. Brumpt sur la base de l'examen morphologique, a décrit une Rickettsia du *Rhip. sang.* qu'il a appelé *Rickett. Conori.*

L'impossibilité de reproduire, au moyen des cultures, la maladie chez l'homme et chez les animaux de laboratoire et l'épuisement du germe au 3ème passage, ne nous autorise pas à exprimer une opinion définitive sur la Rickettsia isolée. Nous croyons qu'il est nécessaire, en présence de formes sérieuses de fièvre exanthématique, de répéter les épreuves de culture dans le milieu proposé par M. le prof. Vernoni.

Institut de Pathologie générale de l'Université de Rome.

ARNAUDI C. et FRANCIOLI M. – **La présence des phosphatases dans les microrganismes. — Ière Note: Hyphomycètes.**

En 1911 Dox et Golden (1) en étudiant les enzymes extraites de différentes moisissures, ont constaté dans l'*Aspergillus niger*, *fumigatus* et *clavatus*, la présence d'une enzyme apte à hydrolyser la phytine, qu'ils ont identifiée avec la phytase qui avait été découverte quatre années avant par Suzuky, Yoshimura et Takaishi (2) dans la bale du riz. En 1912 Jegoroff (3) confirmait la présence de cette enzyme dans l'*Aspergillus niger* et la démontrait même dans le *Pen. crustaceum*. Il faut encore ajouter à ces microrganisme la *Pichia farinosa*, le *Mycoderma a.* (de Takahaohi), l'*Asp. orizae* et la levure de bière étudiés par Shimoda (4) en 1927; cet A. estime que l'activité hydrolytique des extraits de ces moisissures sur la phytine est due à la présence de la phytase.

C'est seulement dans ces dernières années que MM. Belfanti et Contardi (5) ont démontré que le mode de production des hydrolyses déterminées par les phosphatases de la bale du riz, de la levure de bière et des *Asperg. orizae* et *niger* n'est pas — ainsi qu'on le croyait — toujours comparable à l'activité de la phytase, mais peut être tout à fait différent. En effet ces AA. ont établi les trois schémas d'hydrolyse suivants.

a) La phosphatase de la bale du riz décompose la lécithine et la lysocithine en acides gras, en choline et en acide glycérophosphorique.

b) La phosphatase de l'*Asperg. oryzae* décompose la lécithine et la lysocithine en acides gras, en choline, en glycérine et en acide phosphorique.

c) Celle de l'*Asperg. niger* décompose la lécithine et la lysocithine en acides gras, en glycérine, et en éther phosphorique de la choline.

Etant donné l'intérêt de plus en plus grand suscité par ce groupe

d'enzymes, soit pour tout ce qui se rapporte à l'échange des substances phosphorées dans les microrganismes, soit pour l'importance biochimique qu'elles présentent dans la physiologie générale, il nous a paru intéressant d'être fixés sur leur diffusion dans les microrganismes mêmes. Pour nos recherches, nous avions à notre disposition de petites quantités d'extraits de différentes moisissures, que nous avons essayé sur la lécithine d'oeuf et sur la lysocithine.

Nous nous sommes proposés d'étudier l'action enzymatique de nos extraits par rapport à ce phosphatide dérivé, car, en vertu de sa structure il est plus facilement hydrolysé, de sorte qu'il constitue un réactif plus sensible de l'enzyme. Comme l'on disposait d'une faible quantité d'extraits, il n'a pas été possible de les purifier ultérieurement pour les libérer du phosphore éventuellement présent. Cela nous aurait permis de distinguer avec certitude les moisissures qui décomposaient la lécithine et la lysocithine, jusqu'à mettre en liberté l'acide phosphorique, et d'établir, après l'examen des produits de l'hydrolyse, le type de scission auquel aurait pu être rapportée chaque moisissure.

Par nature, tous les extraits étaient plutôt acides (ainsi qu'on peut le voir par les valeurs du pH initial, relevées dans les tableaux ci-annexés) de sorte que leur action a été très lente, soit sur la lécithine, soit sur la lysocithine: c'est seulement après la neutralisation des liquides, que la réaction de scission s'est manifestée plus rapidement.

Nous avons employé, comme lécithine, l'ovo-lécithine extraite, en suspension à 1%. La lysocithine, obtenue par la technique connue (6), en faisant agir le venin de cobra sur la lécithine de l'oeuf, à été employée aussi à 1%.

On avait préparé les extraits des moisissures, en broyant et en pressant à 40 atmosphères les cultures feutrées obtenues pour chaque microrganisme en ballons renfermant la liqueur de Wemer, exception faite, naturellement, pour l'*Amanita* dont nous avons utilisé un seul exemplaire, broyé et pressé comme il est indiqué ci-dessus. Ensuite, les liquides obtenus ont été stérilisés par filtration sur bougie Berkefeld. On a ajouté à 8 cmc. de suspension de lécithine ou de lysocithine, 2 cmc. du liquide d'extraction de chaque moisissure, puis 0, cmc. 2 de toluol. La température de la réaction a été de 45° C.

Les tableaux suivants indiquent les résultats.

ACTION SUR LA LÉCITHINE

TABLEAU I.

EXTRAITS DES MOISISSURES	Au début		Après 24 heures		Après 48 heures		Après 72 heures		Après 144 heures		Après 192 heures (Ca CO_3 gr. 0,300)		Après 274 heures (Ca CO_3 gr. 0,300)	
	pH	choline	pH	choline	pH	choline	pH	choline	pH	choline	pH	choline	pH	choline
1. Aspergillus pseudoflavus .	4,9	—	4,8	—	4,0	———	4,0	———	4,0	———	5,6	———	5,6	———
2. » ochraceus . .	6,0	—	6,0	—	5,5	———	5,3	———	5,3	———	6,5	———	6,5	———
3. » flavus	4,2	—	4,2	—	4,2	———	4,2	———	4,2	———	6,4	———	6,4	———
4. » fumigatus . .	4,2	—	4,0	—	3,8	———	3,6	———	3,8	———	6,6	———	6,6	+++
5. » brunnens . .	5,3	—	5,3	—	5,3	+++	5,3	+++	5,1	+++	6,3	+++	6,0	+++
6. » flavescens . .	5,2	—	5,2	—	5,0	———	4,9	———	4,9	———	6,4	+++		+++
7. » orizae	5,4	—	5,3	—	5,2	+++	5,2	+++	4,9	+++	6,8	+++		
8. Penicilium brevicaule . .	5,2	—	5,2	—	5,2	———	5,3	———	5,3	———	5,5	———		———
9. » luteum . . .	5,2	—	4,8	—	4,6	———	4,0	———	4,0	———	5,8	———		+++
10. » Tossico Carb. e Cazz. . .	5,9	—	5,2	—	5,2	———	5,2	———	5,2	———	5,7	———		+++
11. Trichoderma Koningi . .	5,4	—	5,0	—	4,3	———	3,8	———	4,2	———	6,3	+++		
12. » lignorum . .	5,4	—	4,8	—	4,2	———	4,2	———	4,0	———	5,6	+++		
13. Mucor Boidin	5,2	—	4,0	—	3,8	———	3,6	———	3,7	———	5,8	———	5,0	+++
14. Phoma s. p.	5,4	—	5,2	—	5,0	———	4,8	———	4,8	———	5,2	———	5,6	———
15. Blastodendron Castell. . .	6,5	—	6,2	—	5,6	———	5,6	———	4,9	———	6,8	———	6,6	+++
16. Amanita phalloides . . .	5,4	—	5,2	—	5,2	———	5,4	———	5,3	———	6,3	———	6,3	———
17. Contrôle lécithine . . .	6,5	—	6,5	—	6,5	———	6,5	———	6,4	———	6,5	———	6,5	———

ACTION SUR LA LYSOCITHINE

TABLEAU II.

EXTRAITS DES MOISISSURES	Au début		Après 24 heures		Après 48 heures		Après 72 heures		Après 144 heures		Après 192 heures (Ca CO_3 gr. 0,300)		Après 274 heures (Ca CO_3 gr. 0,300)	
	pH	choline	pH	choline	pH	choline	pH	choline	pH	choline	pH	choline	pH	choline
1. Aspergillus pseudoflavus .	4,5	—	4,4	—	4,4	———	4,2	———	4,0	———	6,5	+++		
2. » ochracens . .	5,3	—	5,5	—	5,5	———	5,5	———	5,5	+++	6,4	+++		
3. » flavus	4,6	—	4,5	—	4,4	———	4,4	———	4,2	———	6,4	———	6,4	+++
4. » fumigatus . .	5,0	—	4,8	—	4,2	———	4,2	———	4,2	———	6,4	+++		
5. » brunnens . .	5,0	—	5,4	—	5,4	+++	5,4	+++	5,4	+++	6,3	+++		
6. » flavescens . .	5,0	—	5,0	—	4,8	+++	4,8	+++	5,0	+++	6,4	+++		
7. » orizae	5,2	—	5,2	—	5,2	+++	5,4	+++	5,2	+++	7,0	+++		
8. Penicilium brevicaule . .	5,5	—	5,5	—	4,9	———	4,2	———	3,8	———	5,5	+++		
9. » luteum . . .	5,2	—	5,2	—	4,9	+++	4,9	+++	4,9	+++	6,2	+++		
10. » Tossico Carb. e Cazz. . .	5,6	—	5,6	—	5,3	———	5,3	+++	5,0	+++	4,8	+++		
11. Trichoderma Koningi . .	4,6	—	4,6	—	4,5	———	4,2	+++	4,2	+++	6,5	+++		
12. » lignorum . .	5,0	—	4,6	—	4,5	———	4,5	+++	4,5	+++	6,0	+++		
13. Mucor Boidin	4,6	—	4,6	—	3,8	———	3,6	———	3,6	———	6,6	———	6,5	+++
14. Phoma s. p.	5,4	—	5,0	—	5,0	———	5,0	———	5,0	———	6,6	+++		
15. Blastodendron Castell. . .	6,2	—	6,2	—	5,0	+++	4,8	+++	5,0	+++	5,0	+++		
16. Amanita phalloides . . .	5,4	—	5,2	—	5,2	+++	5,0	+++	5,2	+++	6,5	+++		
17. Contrôle lysocithine . .	6,5	—	6,5	—	6,5	———	6,5	———	6,5	———	6,5	———	6,5	———

En général on peut constater que, même dans les conditions de nos expériences, la lysocithine, à cause de sa plus grande labilité, a été plus facilement hydrolysée que la lécithine. Mais la lécithine, elle même, a été décomposée par nos extraits, ce que nous pouvons vérifier par la production de choline en plusieurs cas et par la diminution du pH. Ainsi que nous l'avons dit, l'acidité du liquide a empêché l'évolution rapide des actions enzymatiques, et pour certains microrganismes, tels l'*Asp. pseudoflavus*, l'*ocraceus flavus*, le *Pen. brevicaule*, le *Phoma s. p.*, l'*Amanite phalloides*, la neutralisation pratiquée après 144 heures n'a pu réussir à accélérer sensiblement la réaction de scission.

En tous cas, la présence de phosphatases dans les hyphomycètes que nous venons d'étudier, est bien évidente et, étant donné la diversité considérable des genres examinés, il serait légitime de penser que ces phosphatases sont très répandues dans les microrganismes chez lesquels elles jouent, peut-être, un rôle dans le métabolisme des composés phosphorés.

Pour le moment, nous nous bornons à cette constatation, car la détermination de toutes les actions enzymatiques et la classification du type d'hydrolyse exige une étude particulière et un matériel abondant, étude dont nous nous occuperons ultérieurement.

Institut Sérothérapique de Milan.

BIBLIOGRAPHIE

1). *A. Dox* e *R. Goldem*, « Phytase in lower fungi » (Journal Biol. Chem., T. 10, pp. 183-186 1911).
2). *Suzuki, Yoshimura* e *Takaishi*, Bull. of the Coll. Agr. Tokyo 1907, vol. 7, pag. 504.
3). *M. A. Jegorofff*, «Ueber das Verhalten von Schimmelpilzen» (Asper. Niger und Pen. Crustaceum); « Zum. Phytin. » (Zeitschr. f. Physiol. Chemie. Bd. 81, 1912, s. 231).
4). *C. Shimoda*, « On the Occorrence of Phytase in some Yeasts and Aspergill. Oryzae» (Centralblatt f. Back. Paras. und Inf. 71, s. 232-247, 1927).
5). *S. Belfanti* e *A. Contardi*, «Il beri-beri secondo gli ultimi studi». Rapporto alla 20ª Riunione della Società Italiana per il Progresso delle Scienze. Milano, 12-20 sett. 1931.
6). *A. Contardi* et *P. Latzer*, « I veleni animali nella chimica » (Rend. Ist. Lomb., Vol. 60, N. 16-20, 1927).

MASTROENI MARCO – **La chromogénèse chez les germes du type " Brucella " dans un milieu à l'oeuf.**

Sur les conseils de Mr. Le Directeur, j'ai commencé l'étude des propriétés biologique du type *Brucella*. J'ai recherchés, ainsi que l'a fait Mr. Pergola pour d'autres germes, si les *Brucella* cultivées dans un milieu à l'oeuf, pouvaient acquérir un pouvoir chromogène, et si ce caractère pouvait les différencier entr'elles, et du groupe des germes qui produisent ordinairement des septicémies.

Disons tout de suite que, dans un milieu à l'oeuf, la *Brucella melitensis* (var. *hominis*) et la *Br. abortus* (var. *bovis*) que j'ai essayées, présentent après quinze jours environ de développement, un bel enduit de couleur brun-chocolat, uniforme, presque sans relief, aux marges nettes, avec une intensité plus grande chez la *Br. melitensis*, et un peu moindre pour *Br. de Bang.* On ne peut confondre cette couleur avec la teinte que beaucoup de cultures prennent en vieillissant. Inversement, le bacille typhique (j'en ai essayé trois souches), les paratyphiques A. et B., le *B. coli*, le *choléra gallinarum*, le *B. pestis* (de la collection) n'acquièrent jamais la propriété chromogène dans les milieux à l'oeuf qui aident leur développement.

En dehors des souches de la collection, j'ai employé deux souches récentes, isolées par hémoculture de deux malades, ici même à Messine: la première marquée « Br. M. L. R. » et la deuxième « Br. M. E. ». Dans un milieu à l'oeuf, toutes deux présentèrent, très rapidement et très nettement, le phénomène de la chromogénèse.

Il est hors de doute qu'il s'agit d'une activité biochimique du germe, d'où la nécessité d'étudier si cette activité modifie les caractères morphologiques, culturaux et pathogéniques (et en combien de temps); si elle influe sur d'autres propriétés biologiques, et, parmi celles-ci, sur le pouvoir d'agglutination, et enfin, quels sont les facteurs qui déterminent ce pouvoir chromogène.

***

En ce qui concerne les caractères morphologiques, j'ai remarqué seulement une légère modification en ce sens que les *Br. melitensis*, et spécialement l'*Abortus*, prennent la forme bacillaire d'une façon plus nette. Les propriétés de coloration (Gram, etc.) ne subissent aucune modification. L'examen en goutte pendante, produit le mouvement habituel, qui, à mon avis, est autre chose que la simple oscillation vibratoire brownienne. Plusieurs auteurs, par une technique spéciale, ont demontré, du reste, la présence de cils dans la *Brucella* (Gordon, Amato); d'autres chercheurs ont nié le fait, et, moi même, par les méthodes habituelles je n'ai pas pu le constater.

Le passage du milieu à l'oeuf soit en gélose simple ou glycérinée, soit dans du bouillon, rend à la *Brucella* ses caractéristiques normales des milieux ordinaires de culture. Mais, si l'on réensemence celles ci dans un milieu à l'oeuf, la chromogénèse se reproduit constamment; j'ai pu suivre ce phénomène par séries alternées.

Le pouvoir pathogène a été essayé chez le cobaye et chez le lapin, sur des animaux de même poids environ, avec la même quantité de

germes, par voie intrapéritonéale, après examen de la culture pour s'assurer de sa vitalité.

Les cobayes aussi bien que les lapins se sont montrés réceptifs; mais la quantité de germes inoculée est à noter: cinq oeses normales prélevées de l'eau de condensation, mélangée avec l'enduit superficiel d'une culture de 24 heures sur gélose et diluées dans 1 cm. ½ de solution physiologique (trois milliards de germes environ).

L'inoculation a été pratiquée chez quatre cobayes et quatre lapins; deux animaux ont été infectés avec *Brucella melitensis* et *Bang* cultivées dans un milieu à l'oeuf (chromogènes), les deux autres, servant de témoins, avec les mêmes souches (*melitensis* et *Bang*) prélevées de cultures de même âge, en milieux ordinaires (non chromogènes).

Ces cobayes et ces lapins étaient examinés plusieurs fois par jours. On a observé les symptômes généraux suivants: perte de vivacité et du brillant du poil; augmentation de la température rectale d'un degré et demi environ; perte de poids (de 50 à 80 gr. par cobaye); diminution de l'appétit, mauvais état général. C'est ainsi que les premiers jours ils demeuraient à peu près immobiles, et ne répondaient ensuite que tardivement à des excitations, même violentes.

La courbe de température n'a pas été régulière; mais elle a présenté des rémissions de plus en plus longues jusqu'à redevenir définitivement normale.

Pendant quatre semaines consécutives, on a pratiqué chez chaque cobaye et chaque lapin un prélévement cardiaque, avec ensemencement sur gélose glycérinée inclinée et dans un milieu à l'oeuf. On a toujours obtenu le développement de colonies des types respectifs de *Brucella* inoculées, et dans les milieux à l'oeuf un pouvoir chromogène prononcé. A la première ponction de la cavité cardiaque un des cobayes, au lieu de sang, donna un liquide séro-purulent, louche chargé de germes de la *Br. melitensis*; ce liquide séro-purulent disparut peu à peu au cours des prélévements successifs, devenant de plus en plus hémorragique jusqu'à reprendre tous les caractères du sang. *A l'examen du liquide, on trouva de nombreux globules rouges, des pyocytes et des germes de la Br. mélitensis.*

Il se confirme que chez les cobayes, ainsi que chez beaucoup d'autres animaux, l'infection par *Brucella* prend l'allure d'une septicémie chronique, qui peut présenter les processus les plus variés, spécialement dans la rate, dans quelques glandes (mammaires, etc.) et dans l'appareil génito-urinaire. Elle peut parfois altérer profondement la composition du sang jusqu'à lui conférer l'aspect d'un liquide séro-purulent, et produire de notables altérations articulaires. Je reviendrai plus particulièrement sur ces résultats dans un autre travail. Pour le moment, il me suffit de remarquer que le pouvoir pathogène des germes type *Brucella*, cultivés

dans un milieu à l'oeuf, ne subit aucune modification vis-à-vis de celui des germes témoins.

Les *Brucella melitensis* et *Bang*, par passages sur un milieu à l'oeuf (chromogène) ne perdent pas leur pouvoir d'agglutination, qu'on les essaye soit avec du sérum certainement anti-mélitensis (délivré par la Direction Générale de Santé), soit avec du sérum de malades présentant un diagnostic confirmé de fièvre ondulante. Le titre d'agglutination a toujours été de peu supérieur à celui d'agglutinations-témoins, exécutées avec des souches de laboratoires.

Mais le problème le plus important pour la connaissance de ce phénomène, m'a semblé être l'étude de la cause déterminant la chromogénèse chez les germes du type *Brucella* s'il s'agissait de la propriété bien connue de la *Brucella* de dégager de l'H_2S dans certaines conditions favorables (et le milieu à l'oeuf, comme on le sait, serait favorable à cette production) l'ensemencement de la *Brucella* dans des milieux riches en H_2S, aurait dû produire la chromogénèse par un processus en partie photo, et en partie chimio-synthétique, par l'oxydation de l'H_2S et par l'absorption du CO_2 de l'air. Dans ce but, j'ai ensemencé les divers types de la *Brucella* dans, différents milieux (gélose au foie, etc.) ainsi que dans des géloses glycerinées, glucosées, saturées d'H_2S, que j'ai fait barbotter stérilement dans les tubes, en quantités très variables, au moyen de l'appareil de Kipp, avec la réaction suivante:



$$FeS + 2HCl = FeCl_2 + H_2S.$$

Tous ces essais ont été négatifs.

De même, je n'ai pas pu obtenir la pigmentation dans les milieux préparés avec les composants de l'oeuf, selon l'exemple de Mr. Pergola.

A mon avis donc, la chromogénèse des diverses souches de *Brucella*, ne doit donc pas être attribuée aux composants mêmes du milieu à l'oeuf mais, bien plutôt, à des conditions particulières des échanges bactériens avec le milieu et, plus spécialement, à une activité enzymatique de la *Brucella* sur le milieu à l'oeuf. Il y aurait désintégration des substances protéiques libérées de la thyrosine, et, enfin, comme produit terminal du métabolisme protéique, oxydation de la thyrosine et condensation en produits colorés du type des *mélanines*.

Une telle propriété serait *propre* au germes du type *Brucella* (ce qui contribue à définir l'espèce dont la *Br. melitensis* (var. *hominis*) et la *Br. Bang* (var. *bovis*) seraient des variétés voisines, tandis qu'elle n'appartient pas aux autres germes essayés et capables de produire des formes septicémiques chez l'homme et chez les animaux.

RÉSUMÉ.

L'Auteur a remarqué que la *Brucella melitensis* et la *Brucella Bang* acquièrent des propriétés chromogènes dans un milieu à l'oeuf et produisent un enduit muqueux, d'une couleur brun-chocolat, uniforme, peu relevé, nettement borné. La nouvelle propriété acquise ne change pas les caractères morphologiques, culturaux, pathogéniques, ni biologiques.

L'A. attribue le pigment bactérien à des conditions particulières des échanges bactériens sur le milieu à l'oeuf, aboutissant à la désintégration terminale des substances protéiques, avec oxydation de la thyrosine qui résulte de ce métabolisme.

Il retient que cette propriété chromogène particulière caractérise les *Brucella* (*Melitensis* et *Bang*) et qu'elle les différencie des autres germes,

Bureau d'Hygiène et Santé de Messine – Laboratoires de l'Hopital Municipal « al Ritiro ».

BIBLIOGRAPHIE

Trambusti, in Lustig, « Mal. inf. nell'uomo e negli animali ». II Ed.
Alessandrini, « Trattato it. d'igiene », VI volume.
Violle, « La fièvre ondulante ». Masson, Paris.
De Rossi G., « Micr. Agraria e tecnica » (U. T. E. T.), Torino, 1927.
Gotschlich E., in *Kolle* et *Wassermann*, « Hand. d. path. Mik. », III Ed.
Lieske R., « Allgemeine Bakterienkunde » (Gebr. Borntraeger ed. Ber.), 1926.
Pergola M., « Contributo alla biologia dei Cromogeni » (Ann. d'Ig., Vol. 27), 1917.
Galeotti G., « Ricerche biolog. su alcuni batteri cromogeni ». (Sperimentale, Vol. 46, 1892).
Carbone, « Ricerche sull'origine di alcuni pigmenti microb. con speciale riguardo alla tirosinasi » (Rend. Ist. Lomb. d. Sc. e Lett., II, vol. 39, 1906).
Gessard C., « Variété mélanogène de B. pyocyanique » (Ann. Past., Vol. 15, 1901).
Lehmann K. B. et *Sano*, Arch. f. Hyg., Vol. 67, 1908.

TENEFF S. – **Les érythrocytes n'absorbent pas les isoagglutinogénes des hémolysats d'érytrhocytes A. et B.**

Une des questions les plus discutées dans l'étude des propriétés de spécificité de groupes est incontestablement celle qui se rapporte à la nature et aux propriétés des isoagglutinines et des isoagglutinogènes. Mais, tandis que les isoagglutinines commencent à prendre une image plus nette, mieux interprétable dans l'étude du problème des propriétés des spécificités de groupe, à la suite des recherches récentes (Schiff), les isoagglutinogènes, restent beaucoup plus mystérieux, plus impénetrables à nos recherches. On interprète moins bien leur manière particulière de se comporter au point de vue de leur action biologique et de leur composition physico-chimique.

De recherches récentes (v. Dungern et Hirschfeld, Jones, Happ) il ressort que dès la différentiation des tissus et des globules rouges, chez l'embryon même, apparaissent les isoagglutinogènes, qui constituent une propriété primitive strictement biologique des globules rouges (Lattes).

Les isoagglutinogènes sont à la base du phénomène constitutionnel et héréditaire, le plus caractéristique de l'individualité. Ils forment une partie intégrante de l'organisme dans lequel ils se trouvent; ils sont sujets à des variations quantitatives dans des conditions physiologiques et pathologiques, mais ils ne disparaissent jamais des tissus et il ne changent jamais de propriété.

***

J'ai voulu étudier dans mes recherches s'il est possible de rendre agglutinables « in vitro » les globules rouges qui ne contiennent pas d'agglutinogènes (gr. 1) après un traitement par des hémolysats d'érythrocytes *A* et *B*. La capacité d'absorption de quelques substances a déjà été démontrée par plusieurs auteurs. Koslovski a étudié l'absorption des substances nutritives; l'absorption des hormones a été mise en évidence par Gedroyc et Koslovski. Les globules rouges isoagglutinogènes, mis éventuellement en liberté par l'hémolyse, possèdent-ils la faculté d'absorption ?

Technique. — Le matin, à jeûn, on recuille 3 c. c. de sang du gr. I, et 3 c. c. de sang du gr. II et du gr. III, on les mélange respectivement avec 7 c. c. d'une solution de citrate de sodium à 2%. On pratique trois fois la centrifugation et le lavage avec de la solution physiologique. Les globules rouges *A* et *B* ainsi obtenus sont hémolysés dans 10 c. c. d'eau distillée, et l'hémolysat est en partie centrifugé et décanté, et en partie non. On laisse au contraire les globules rouges *O*, en suspension dans 5 c. c. de solution physiologique.

On prépare les essais dans une série de tubes, pour chaque cas:

1°) deux tubes contenant 0,5 c. c. d'hémolysat centrifugé de gl. rouges *A* ou B + 2 gouttes de suspension de globules rouges *O* + 0,5 c. c. de sérum à un haut taux agglutinant (1:200) respectivement α et β.

2°) deux tubes contenant 0,5 c. c. d'hémolysat non centrifugé de globules rouges *A* ou *B* + 2 gouttes de globules rouges *O* + 0,5 c. c. de sérum du groupe opposé aux globules rouges hémolysés.

3°) deux tubes contenant 0,5 c. c. d'hémolysat centrifugé de globules rouges *A* ou *B* + 2 gouttes de globules rouges *O*.

4°) deux tubes contenant 0,5 c. c. d'hémolysat non centrifugé de globules rouges *A* ou *B* + 2 gouttes de globules rouges *O*.

5°) deux tubes contenant 3 c. c. d'hémolysat centrifugé de globules rouges *A* ou *B* + 1 c. c. de globules rouges *O*.

Tous les tubes sont gardés à l'étuve à 37° pendant une heure,aprés quoi les tubes de la série 1 et 2, après avoir été secoués, sont examinés au microscope. Dans les tubes des séries 3 et 4, on ajoute 0,5 c. c. de sérum par tube, avant de contrôler les résultats au microscope.

Le contenu des tubes de la série 5 est centrifugé, les érythrocytes qui sont restés au fond sont lavés deux fois avec de la solution physiologique, et mélangés ensuite avec 3 c. c. de sérum respectivement α et β; ces derniers tubes aussi sont contrôlés au microscope.

A l'examen macroscopique de tous les tubes on n'a pas pu constater de phénomènes d'agglutination. Ayant répété l'examen microscopique du contenu des tubes de la série 1 et 3, aucun groupe d'agglutination n'a été mis en évidence, et les globules rouges ont paru distribués d'une façon homogène dans tout le champ. Quelque peu différent, mais nettement négatif a été l'examen microscopique des séries 2 et 4. Dans quelques points du champ, on remarque des groupements de débris formant ombre de globules rouges hémolysés; les globules rouges entiers (gr. 0) sont épars par ci et par là dans tout le champ et mêlés à de nombreuses ombres non groupées de globules rouges hémolysés.

Dans le contenu des tubes de la série 5, il n'y a aucune trace d'agglutination microscopique.

D'après cette technique, on a étudié la manière de se comporter des globules rouges chez 12 personnes du gr. A, en les mettant en contact avec des hémolysats d'érythrocytes, soit du groupe II, soit du groupe III. Dans tous ces essais, le résultat a été également négatif; on n'a pu dans aucun cas remarquer, ni une véritable agglutination, ni même une tendance à cette agglutination des érythrocytes du gr. 1.

***

Les résultats négatifs de mes recherches démontrent que les globules rouges intacts du gr. 1 ne prennent pas, des hémolysats de globules rouges des gr. II et III, les propriétés nécessaires pour acquérir l'agglutinabilité. Deux questions se présentent, pour expliquer cette constatation:

1°) Des substances d'une composition chimique définie, dans l'hémolysat de globules rouges *A* et *B*, douées de la propriété de provoquer l'agglutination, peuvent-elles être libérées?

2°) Ces substances peuvent-elles être absorbées par les globules rouges *O* et déterminer ainsi l'agglutinabilité?

Les recherches soigneuses par lesquelles on a cherché de détacher

les isoagglutinogènes des érythrocytes en soumettant ceux-ci à des traitements chimiques ou physiques répétés (ac. borique, bicarbonate de soude, lavages successifs avec de la solution physiologique, centrifugation, agitation des tubes, etc.), sans altérer leur intégrité morphologique ont donné dés résultats négatifs par rapport aux témoins quantitatifs (Gedda et Pecorella). Selon Landsteiner l'isoagglutinogène aurait la composition d'un lipoprotéide, avec une fraction lipoïdée et une fraction protéïque. Cette structure biochimique complexe de l'isoagglutinogène est d'ailleurs analogue à la structure du protoplasma vivant, qui, avec son activité est l'expression de tous les phénomènes fonctionnels. La composition chimique ci-dessus, explique donc les résultats de Gedda et Pecorella, et seule la destruction des érythrocytes peut mettre en liberté les substances spécifiques. Par l'hémolyse des globules rouges, ces substances se retrouvent, en partie en suspension dans le liquide et en partie accolées aux débris des érythrocytes. Mais il est probable qu'avec la destruction du protoplasma elles perdent partiellement leurs propriétés. Soit que les isoagglutinogènes, par la destruction des érythrocytes, subissent une altération, soit aussi probablement que les globules rouges *O* ne possèdent pas le pouvoir d'absorber et de fixer ces substances, il n'y a pas la possibilitè de changer la réaction de groupe des érythrocytes *O*. La structure biochimique bien définie des érythrocytes *O* ne laisse place à aucune modification tendant à déterminer l'apparition de nouvelles propriétés qui n'aient pas leur origine dans une signification physiologique propre. La présence ou l'absence d'isoagglutinogènes détermine le groupe sanguin dans le développement ontogénétique, parmi les propriétés de spécificité de groupe ces caractères sont transmis par hérédité et ils sont liés à la constitution cellulaire acquérant ainsi une forte signification dans la question de l'individualité.

Institut et Clinique de Pathologie Chirurgicale
de l'Université Royale de Turin.

BIBLIOGRAPHIE

V. Dungern et *Hirschfeld*, Z. f. Imm. forsch., 1910.
Gedda L. et *G. Pecorella*, Giornale di Batter, et Imm., vol. V, 1930.
Gedroy C. et *Koslovski*, C. R. Soc. Biol., 1930.
Happ, J. of exp. Med., 1920.
Koslovski, « Kosmos », 1930.
Lattes, « La individualità del sangue ». Relazione al III Congresso Nazionale di Microbiologia. Milano, 1931.
Schiff et *Akune*, Münchener Med. Woch., 1931.

DONADEI G. - Études sur la réaction du milieux de culture des germes isolés du nez de sujets sains et ozéneux (1).

Les recherches dont suit la relation ont pour but l'étude de la réaction du milieu de culture des germes qui forment la flore microbienne des fosses nasales de sujets ozéneux, par rapport aux réactions que produisent les germes isolés sur des personnes saines.

Il m'a semblé bon de pratiquer ces recherches en prenant comme base le fait, observé par plusieurs AA. dans ce même Laboratoire, que lorsque les conditions d'équilibre de l'organisme se trouvent altérées, les germes des cavités naturelles sont sujets à des variations de leur activité biochimique.

Mes recherches ont été faites sur 25 sujets ozèneux et sur 12 sujets sains: pour chacun d'eux j'ai examiné plusieurs fois, très soigneusement, la flore microbienne et pour chaque espèce microbienne j'ai étudié, outre l'activité biochimique, les modifications du pH des cultures en bouillon, ayant un pH initial sensiblement neutre.

Dans les fosses nasales des sujets sains j'ai, en général, isolé cinq ou six espèces de *cocci* dont certaines liquéfiaient la gélatine et d'autres non; presque toutes avaient la propriété de faire fermenter, en produisant des acides, le glucose, le lévulose, le maltose, le saccharose et la mannite.

Ensemencés en bouillon neutre, ces germes ne le rendaient pas acide, ou bien ne l'acidifiaient que très légèrement: le pH des cultures ne descendait que très peu au dessous de 7, ou bien ne variait pas du tout.

J'ai aussi isolé, en certains cas, des bactéries dont certaines ne pouvaient être identifiées d'une façon certaine, et d'autre furent reconnues comme étant du *B. coli*. J'ai remarqué que les bactèries rendaient le milieu plus acide que les cocci: le pH descendait, en ce cas, souvent à 6,8-6,6.

Chez les ozèneux, j'ai pu observer les cinq ou six espèces de *cocci* qui sont présentes dans les cavités nasales des personnes saines: dans quelques cas, j'ai aussi observé la présence de cocco-bactéries qui selon toute probabilité étaient très voisines du *b. de Serez* sinon identiques: je n'ai point trouvé le *B. coli*, mais de souches anormales qui pourraient aussi être des formes dégénérées du *B. coli*.

Enfin j'ai aussi observé en certains cas la présence de corynebactéries, de phtéromorphes.

Tous les germes examinés démontraient à peu près la même activité biologique: pour ce qui est de la réaction du milieu j'ai, au contraire, remarqué des différences assez considérables.

---

(1) Conférence lue au 2ème Congrès International d'Otorhinolaryngologie. Madrid, sept. 1932.

En les ensemençant en bouillon neutre, presque tous ces germes donnaient lieu à une acidification du milieu beaucoup plus considérable que celle produite par ceux isolés chez les sujets normaux; il m'est souvent arrivé de remarquer des diminutions du pH de 5 à 6 degrés.

Les résultats de mes recherches confirment l'hypothèse que le changement des conditions du milieu « in vivo » a une influence sur la flore microbienne de la région.

Bien que ces données ne me permettent pas d'en tirer des conclusions fondamentales, il faut pourtant admettre, en se basant aussi sur les expériences d'autres AA. dans ce Laboratoire, sur la variabilité de l'activité de la flore microbienne des cavités naturelles en rapport avec des altérations de l'équilibre organique (avitaminose, jeûn, etc.), qu'elles apportent une contribution à l'hypothèse que, dans des cas d'ozène, on est en présence de processus dystrophiques de l'organisme, surtout au niveau des fosses nasales.

Institut de Bactériologie et d'Immunologie de l'Université Royale de Turin. Laboratoire pour les Recherches Bactériologiques de l'Hôpital « Amedeo di Savoia ».

LOMBARDO-PELLEGRINO P. - **Le pouvoir vaccinant du crachat tuberculeux.**

Les méthodes de vaccination antituberculeuse, employées par les AA. qui se sont occupés de ce sujet, reposent toutes sur les bases classiques de l'immunité active acquise: c'est-à-dire que l'on a employé successivement pour obtenir cette immunité:

a) des bacilles morts (Maragliano);

b) des bacilles vivants (virulents) (rendus avirulents, à différents degrés et par différents procédés);

c) des bacilles para;

d) des produits bactériens (tuberculines).

Pour un exposé de détail je renvoie à la communication très étudiée de Mr. le Prof. Puntoni (Congrès de la Section Italienne de la Société internationale de Microbiologie, « Compt. Rend. », Vol. III, a. 1931).

Une autre méthode postérieure à cette communication ne pouvait donc pas y être comprise. Tout en appartenant à la catégorie *b*, puisqu'elle utilise des bacilles vivants et virulents, elle est inspirée d'autre part d'une idée personnelle originale. C'est la méthode de Belfanti et Dessy (*Bull. de la Section Italienne de la Soc. Intern. de Microbiologie*, Fasc. VII-VIII, 1931); l'essentiel de cette méthode consiste dans l'emploi

d'une substance (saponine) capable de produire un oedème réactionnel, localisé au point d'inoculation (rigoureusement sous-cutané) qui incorporerait les bacilles et ne permettrait leur libération que lentement, et ensuite leur pénétration graduelle dans l'organisme, à fur et à mesure que l'oedème se résorbe. On viendrait ainsi à déterminer une infection bacillaire graduée, capable de conférer une *prémunition* définitive à l'organisme même.

La modification que le Bac. tuberculeux subit par le contact de 72 heures à l'étuve avec la saponine (c'est-à-dire la perte de l'acido-resistance: Arima, Puntoni), aurait une valeur tout à fait secondaire, puisque le rôle le plus important serait joué par la réaction inflammatoire locale due à une action chimique.

Tous les AA. affirment avoir obtenu par leurs méthodes vaccinales, d'importants succès; et presque tous sont d'accord désormais sur le principe fondamental de Calmette, qui explique le phénomène immunitaire pour la tuberculose (ainsi que pour d'autres maladies) comme un état allergique particulier, déterminé par une véritable infection localisée, qui met l'organisme dans un état plus ou moins durable de résistance, en le prémunisant contre les dangers d'une future invasion. Le terme de *prémunition*, caractérise et définit ce phénomène; en outre, les réactions allergiques ordinaires le mettent en évidence, par le phénomène bien connu de Koch, qu'on peut interpréter comme un indicateur de l'état allergique. Cependant pour obtenir l'état de prémunition, un vaccin anti-tuberculeux serait d'autant plus efficace qu'il produit plus promptement, certainement et d'une manière constante l'infection localisée chez l'animal; que la voie d'introduction est plus directe, plus facile et plus sûre; que l'état allergique protecteur qu'il détermine est plus prononcé et plus durable.

***

Prenant ces bases comme point de départ, au cours de quelques recherches sur le crachat tuberculeux, dont je rendrai compte en temps voulu, j'étudiai si le crachat tuberculeux *in toto*, était capable de prémunir les cobayes, après avoir été traités de façon convenable par un séjour prolongé à l'étuve à 37°, afin de laisser s'accomplir les processus d'autodigestion des bacilles, des produits tuberculeux, de la flore coexistante et des composants protéïques du crachat, par l'action des diastases salivaires.

Le crachat tuberculeux déjà après une semaine de séjour à l'étude, se divise en une partie superficielle fluide, blanche-opaline, et en un dépôt plus foncé, plus dense, constitué surtout par les débris organiques et inorganiques du crachat.

Les bacilles tuberculeux semblent d'abord plus nombreux, et au bout d'un mois complet, j'ai réussi à les cultiver dans un milieu à l'oeuf sous la forme de *Mycobactérium tuberculosis* (var. *hominis*). Le diplocoque peut aussi se conserver pendant un mois vivant, sauf que les éléments paraissent plus gros, ne se cultivent de nouveau qu'avec difficulté et seulement sur de la gélose au sang de lapin. Parmi les autres germes présents dans le crachat, le *B. proteus* est celui qui, après le diplocoque, offre le plus de résistance à l'action lytique des ferments salivaires.

Après trois mois de séjour à l'étuve, *les bacilles tuberculeux* demeurent encore très nombreux; ils se colorent bien et gardent leur pouvoir pathogéne, *bien que fort attenué;* mais jusqu'à présent, je n'ai pas encore réussi, par aucune technique, à les cultiver directement du crachat.

L'atténuation du pouvoir pathogène est démontrée par l'évolution de la maladie expérimentale, beaucoup plus lente si on la compare à celle qui évolue chez des témoins inoculés avec du crachat récent (cobaye témoin mort au cours de la 5ème semaine; cobaye inoculé avec du crachat de trois mois, sacrifié à la 10ème semaine). L'autopsie montre la même différence; par inoculation d'un crachat de 3 mois, on provoque une tuberculose des glanglions lymphatiques, avec de rares foyers caséifiés; le témoin par contre donne toutes les lésions caractèristiques d'une tuberculose généralisée.

Cette série d'expériences été àfaite par injections sous-cutanées, chez des cobayes de la même portée, à peu près du même poids, et avec une émulsion bactérienne à peu près égale. On admet que six oeses normales du culot de centrifugation d'un centimètre cube de crachat de trois mois, repris dans un cmc. de solution physiologique, correspondent à trois oeses normales du culot de centrifugation de crachat récent, préalablement traité par la méthode d'Horn, et repris avec un cmc. de solution physiologique. On inocule un centimétre cube complet du matériel virulent émulsionné.

Des glanglions .lymphatiques des animaux sacrifiés ou morts, on cultive de nouveau le bacille de la tuberculose. Le crachat tuberculeux après un séjour ultérieur à l'étuve, se dessèche peu à peu, se brunit, se densifie, jusqu'à prendre l'aspect du cérumen de l'oreille; l'odeur est celle de peptone altérée; il acquiert la consistance molle et visqueuse du cérumen, consistance qui augmente jusqu'à durcissement complet par séjour plus prolongé à l'étuve. Lorsque le crachat prend l'aspect du cérumen (ce qui selon la quantité de l'expectoration arrive, entre six mois et un an), les bacilles tuberculeux, dans leur forme acido-alcoolo-résistante, sont très petits, plus courts; quelques uns présente une extrémité en massue, d'autres sont colorés en chaînette; on ne voit pas d'autres formes bacté-

riennes, à l'exception des diplocoques grossis, légèrement colorés en bleu et ne donnant plus de possibilité de culture.

Par la méthode de Gram, utilisée en chauffant jusqu'à apparition de vapeurs, on voit dans l'expectoration des formes résistantes à la décoloration, mais prenant avec peine le colorant, à filaments plus ou moins longs, avec de véritables ramifications; de nombreuses formes granulaires de la grandeur des *cocci* ordinaires, fortement colorés en bleu, enfin, quelques granules ponctiformes colorés avec la couleur rouge de fond.

Je n'ai rien de spécial à indiquer sur la technique de préparation du crachat: cérumen, délayé dans de l'eau stérile et fixé par dessication.

Pour mes essais, j'ai employé un crachat-cérumen tuberculeux, ayant séjourné pendant exactement 12 mois à l'étuve.

De ce crachat-cérumen j'ai pris, stérilement, une quantité à peu près de la grosseur d'un grain de millet, que j'émulsionnai soigneusement dans 6 cmc. de solution physiologique; la moitié de cette dose a été inoculée au cobaye *A*, du poids de 230 gr., et l'autre moitié au cobaye *B* du poids de 205 gr.

Je pratiquai l'inoculation par voie intrapéritoneale, parce que dans une série d'expériences préliminaires, sur lesquelles je n'insiste pas, je remarquai que la voie intrapéritonéale est la plus prompte, la plus constante et la plus sûre pour produire une infection localisée-vaccinante, sans qu'il reste aucune trace de lésion dans la séreuse, décelable autrement que par l'hypertrophie des ganglions mésentériques.

Je délayai la même quantité du même crachat-cérumen dans 6 cmc. de solution physiologique et je la gardai à l'étuve à 37° pendant 24 heures. Le lendemain, je filtrai le tout sur bougie Berkefeld-Lilliput, à une atmosphère, avec une bougie neuve, controlée avec le *B. prodigiosus*. J'obtins 3 cmc. de filtrat, environ, que j'injectai, toujours dans le péritoine, au cobaye *C* du poids de 215 gr.

Après un mois et demi, je sacrifiai le cobaye *A*. Il avait augmenté de poids de 50 gr. L'examen à l'autopsie était absolument négatif, comme j'ai déjà dit, à l'exception de l'hypertrophie des ganglions mésentériques. Dans les préparations effectuées avec des frottis de ces ganglions, je ne trouvai pas de formes bacillaires acido-résistantes; il fut impossible de cultiver le bacille de Koch, ni de reproduire la maladie avec de l'émulsion ganglionnaire inoculée à un autre cobaye.

Pour provoquer le phénomène de Koch, je pratiquai chez les cobayes *B* et *C* l'inoculation sous-cutanée d'une dose massive de bacilles tuberculeux, contenus dans le crachat récent d'un tuberculeux, riche en bacilles, et traité par la méthode de Horn; je remplis avec ceux-ci trois tubes à centrifuger; je laissai centrifuger pendant longtemps, et après l'avoir lavé deux fois avec une solution physiologique stérile, j'inoculai « in toto »

sous la peau, le culot de centrifugation de chaque tube, un, au cobaye *B*; un, au cobaye *C*, et celui du troisième tube, au cobaye *D* du poids de 190 gr., comme témoin.

Chez le cobaye *B*, le phénomène de Koch se manifesta très nettement; et en 28 jours j'obtins la guérison complète. Le cobaye *D* (témoin) mourut en un mois, avec tous les signes de tuberculose généralisée. Le cobaye *C* présenta le phénomène de Koch, avec formation d'une large ulcération, de même que chez le cobaye *B*; mais les bourgeons réparateurs furent ternes et lardacées; le matériel prélevé au fond de l'ulcère contenait sur les préparations des formes bacillaires acido-résistantes; on n'obtint pas de formation de croûte superficielle et le processus de cicatrisation, qui n'était pas encore complet après trois mois, puisque la croûte persistait dans l'angle supérieur, de la grandeur d'un petit centime, indiquait, ainsi, l'incomplète réparation du tissu.

Il est évident que l'état de prémunition du cobaye *C*, à qui j'avais inoculé le filtrat du crachat-cérumen, détermina une réaction de moindre intensité et à évolution plus lente.

Je répètai l'essai chez deux petits cobayes âgés d'un mois et de la même portée, tous les deux du poids de 130 gr. Au premier, j'inoculai dans le péritoine, deux cmc. de l'émulsion dans 6 cmc. de solution physiologique de la valeur d'un grain de millet du même crachat maintenu depuis une année à l'étuve. Au second, j'injectai (toujours dans le péritoine), deux cmc. du filtrat de la même émulsion sur bougie de Lilliput.

Les animaux bien nourris et gardés dans des cages ensoleillées augmentèrent de poids ;ayant pratiqué, au bout d'un mois, l'intra-dermoréaction à la tuberculine (sur la peau du dos, bien rasée) on obtint un résultat incertain, un peu plus net chez le cobaye N.º 1. Au bout d'un mois et demi, je repétai, avec la technique indiquée précédemment, le phénomène de Koch sur les deux cobayes. Chez tous les deux, j'obtins un résultat positif; mais, cette fois aussi, la réparation des tissus fut plus lente et moins franche chez le cobaye inoculé avec le filtrat.

Je fis une troisième série d'expériences en vaccinant avec la même technique et avec le même crachat, un cobaye femelle gravide depuis une semaine; la grossesse arriva à son terme, d'où nacquirent deux petits cobayes. Aucun des deux ne présenta d'intra-dermoréaction positive à la tuberculine. Cependant, afin de provoquer le phénomène de Koch, j'inoculai à l'un des deux petits cobayes, une assez forte dose bactérienne de bacilles contenus dans le centrifugat d'un crachat tuberculeux récent, enrichi par la méthode habituelle de Horn, et lavé dans de la solution physiologique. J'obtins un résultat négatif, avec la mort de l'animal en 16 jours, et tous les symptomes de tuberculose généralisée.

Chez le petit cobaye ayant survécu, je pratiquai la vaccination intrapéritonéale, avec 2 cmc. de l'émulsion du crachat de 12 mois.

Après une semaine, l'intra-dermoréaction à la tuberculine fut décidément positive, au bout de deux mois, le phénomène de Koch fut positif. Chez la mère, également, le phénomène de Koch fut positif. Ces expériences se poursuivent; mais, dès aujourd'hui, je me crois autorisé à communiquer:

1°) Après autodigestion à l'étuve à 37°, pendant 12 mois, d'un crachat tuberculeux, son inoculation dans le péritoine, met constamment et sûrement les cobayes dans un état de prémunition.

2°) On peut attribuer cet état à une infection pluribacillaire par germes attenués, localisée probablement dans le péritoine, mais dont, au bout d'un mois et demi (limite *minima* dans laquelle j'ai sacrifié les cobayes) il ne reste aucune trace, autre que l'hypertrophie des ganglions mésentériques.

3°) Une telle infection n'est pas seulement déterminée par les formes bacillaires reconnaissables par leur acido-résistance, mais aussi des granulations résultant de la lyse bacillaire et capables de traverser la bougie de Lilliput. Dans le mécanisme vaccinal entrent très probablement en jeu, aussi, les produits bacillaires du bac. de Koch, et les éléments organiques peptonisés du crachat.

4°) La vaccination (au cours de grossesse) ne transmet pas l'état de prémunition aux nouveau-nés.

5°) L'inoculation du crachat-vaccin, même à dose massive, ne produit pas chez les animaux les lésions spécifiques du bacille de la tuberculose.

RÉSUMÉ

L'A. gardant en autodigestion à l'étuve à 37° des crachats riches en bacilles tuberculeux, jusqu'à ce qu'ils prennent l'aspect du cérumen (ce qui, selon la quantité du crachat, arriverait entre six mois et un an) et en inoculant dans le péritoine des cobayes des crachats d'un an, a constamment et sûrement obtenu une action prémunisante, décelable par le phénomène très connu de Koch.

L'A. aurait obtenu la même action avec le filtrat du même crachat sur bougie Berkefeld-Lilliput; mais l'état allergique s'est montré inférieur et les réparations cicatricielles des tissus plus lentes.

L'A. croit que la prémunition des cobayes doit être attribuée à une infection, attenuée, pluribacillaire, localisée dans la séreuse péritonéale; pourtant, il ne resterait aucune trace visible (excepté l'hypertrophie des ganglions mésentériques, qui cependant ne présentent pas des lésions

spécifiques du bacille tuberculeux). Cette infection, en dehors des formes encore reconnaissables par leur acido-resistance, serait aussi déterminée, par les granulations produites par la lyse bacillaire, capables de traverser la bougie de Lilliput, de même que par les sécrétions bacillaires du bac. de Koch et par les éléments organiques du crachat autodigéré.

Chargé d'Hygiène à l'Inst. R. Sup. de Doctorat de Messine.

VERDINA C. – **Sur la présence dans le sang du myco-bacterium tuberculeux au cours du pneumothorax thérapeutique.**

On connait les recherches de Löwenstein et de ses collaborateurs sur la bacillémie tuberculeuse, recherches qui tenderaient à modifier l'ancienne conception d'après laquelle il est difficile de mettre en évidence le phénomène en question, et à étendre le champ clinique de la diffusion endogène de l'infection tuberculeuse, par la voie sanguine.

Cet A. a préconisé, dans une série de travaux, une méthode originale basée sur le traitement préalable du sang à injecter par l'acide acétique, afin d'éliminer totalement l'hémoglobine, ainsi que l'emploi d'un milieu de culture particulier, solide, dépourvu de la peptone et ayant la propriété d'empêcher le développement de la mycobactérie tuberculeuse. Il affirme que la bacillémie est bien plus fréquente qu'on ne le croit, et émet aussi l'hypothèse qu'au cours de l'évolution de l'infection tuberculeuse, ce ne sont pas seulement des admissions passagères et intermittentes de bacilles dans le sang que l'on constate, mais de véritables décharges bactériennes, presque continuelles.

Cependant, les recherches de contrôle que plusieurs AA. ont effectuées, n'ont pas vérifié cette affirmation; elles n'ont amené qu'à des résultats plutôt limités, et parfois même tout à fait négatifs.

Ainsi, dans notre institut, M. Favero (voir la bibliographie dans le N.° 5, 1931, du « *Bollettino d. Soc. Internaz. di Microbiologia, Sez. Italiana* ») dans 40 cas de tuberculose pulmonaire avérée a obtenu constamment, sur 480 essais de culture, des résultats négatifs.

En raison de ces données fort divergentes et du fait de l'introduction ultérieure d'améliorations fondamentales de technique pour la mise en évidence du phénomène, j'ai cru intéressant de pratiquer d'autres essais de cultures. J'ai utilisé du sang prélevé chez des tuberculeux, à des périodes particulièrement favorables à la manifestation de ces phénomènes bacillémiques, c'est-à-dire au moment d'un pneumothorax thérapeutique, dans les premiers moments de collapsus des processus d'infiltration.

En réalité, la compression réalisée par le gaz introduit dans la cavité pleurale, développe non seulement une action mécanique vis-à-vis des foyers exsudatifs ou ulcératifs, mais elle détermine aussi des troubles de la circulation et des obstructions bronchiques, ce qui favorise énormement la pénétration des germes spécifiques dans le sang. D'ailleurs, on sait qu'en pratiquant le pneumothorax thérapeutique, on observe des modifications sérologiques de nature immunitaire, telles que l'élévation de l'index opsonique (Carpi), l'augmentation des anticorps tuberculeux déviant le complément (Wolf), l'accroissement du pouvoir bactéricide du sang *in toto* (Verdina), les oscillations du pouvoir phagocytaire du sang (Verdina). Toutes ces modifications ne s'expliquent pas entièrement par la simple augmentation du pouvoir de réabsorption des produits toxiques de nature tuberculinique, car ceux-ci — comme il ressort des recherches mêmes faites récemment par M. Pesch — n'exercent qu'une action antigènique presque nulle. L'hypothèse d'une introduction discrète de bacilles dans le sang, dans le sens indiqué par Löwenstein, insuffisante pour provoquer des foyers métastasiques, rencontrerait donc un certain crédit.

Je me suis proposé d'élucider ce dernier problème, en appliquant scrupuleusement toutes les récentes acquisitions de la technique préconisée par les différents AA. qui se sont occupés de la bacillémie tuberculeuse.

Expériences. — Avant-tout, l'on a choisi des malades porteuses de formes récentes, exsudatives, plutôt étendues, ou bien ulcératives à caractère progressif; dans le but d'exploiter au maximum le facteur mécanique du collapsus, l'on à suivi, par des examens successifs, que les patientes chez lesquelles le collapsus même avait été important.

Le sang a été prélevé par quantités de 20 cmc., douze heures après l'intervention du pneumothorax; la deuxième fois, on a retiré le sang après 24 heures et la troisième dans un délai variant de 3 à 5 jours, suivant l'évolution du collapsus pulmonaire, contrôlé par l'examen radiologique et clinique.

Ces études on porté au total sur 15 pneumothorax; on a pratiqué pour chacun d'eux 12 prélèvements, avec un total de 180 hémocultures, et 6 inoculations au cobaye, avec un total de 90 épreuves biologiques. Pour la technique, j'ai scrupuleusement suivi toutes les règles indiquées par Löwenstein.

On prélevait le sang, avec toutes les règles de l'asepsie, au pli du coude, 20 cmc chaque fois, au moyen d'une seringue de cristal, stérilisée à sec, dans laquelle on aspirait préalablement 6 cmc. de citrate de soude à 10%. Ensuite, on additionnait ce sang, pendant 5 minutes d'une solution d'acide acétique au 5%, en parties égales (environ 20 cmc.) puis on le centrifugeait. Le sédiment obtenu était lavé deux fois de suite

à l'eau bidistillée, stérile, afin d'éliminer l'hémoglobine. Toutes ces manipulations ayant été pratiquées stérilement, on a évité le traitement par l'acide sulfurique à 15%. L'ensemencement a été pratiqué avec une pipette stérile, du diamètre de 3-4 mm.; les grands tubes ont été soigneusement fermées avec de la plastoïdine, afin d'éviter le desséchement puis on les a placées à l'étuve, dans la position horizontale habituelle.

Le milieu de culture a été préparé suivant la formule tout récemment préconisée par Löwenstein. Je préparais, en effet, une solution de 1 gr. de phosphate monopotassique; 1 gr. de citrate de soude; 1 gr. de sulfate de magnésium; 3 gr. d'asparagine; 60 gr. de glycérine, dans de l'eau distillée, jusqu'à atteindre le volume total de 1000 cmc. Chaque 150 cmc. de solution étaient additionnés de 12 cmc. de glycérine et de 6 gr. de farine de pomme de terre. Je faisais cuire le tout pendant 15 , en agitant fréquemment, après quoi je le laissais au bain-marie à 56°, pendant une heure. Ensuite je mettais 4 oeufs (préalablement lavés avec de l'alcool) et un jaune d'oeuf dans un ballon stérile, avec des billes de verre; j'agitais jusqu'à homogénéisation complète, puis je filtrais sur gaze dans le ballon où se trouvait déjà prête l'autre solution. J'ajoutais encore 10 cmc. d'une solution à 2% de rouge Congo, ou bien 5 cmc. de vert de malachite, toujours à 2%.

Ensuite je faisais la répartition du milieu dans de grands tubes contenant chacun de 5 à 6 cmc.; je pasteurisais à 80° deux fois, à la vapeur sans pression pendant deux heures, deux jours successivement.

La sterilité du milieu a été contrôlée, pendant quelques jours, en le maintenant à l'étuve à température constante. On a toujours employé des milieux préparés depuis moins de 20 jours.

On ensemencait la moitié du sédiment ainsi obtenu, respectivement dans deux tubes au rouge Congo et dans deux autres au vert de malachite. Le tout était gardé à l'étuve, à la température constante de 38° et la culture, qui a été prolongée au delà de 60 jours, fut soigneusement suivie soit par examen direct à l'oeil nu, soit à la loupe. Indépendamment des résultats de ces examens, on pratiquait pour chaque tube un examen microscopique en frottis colorés, d'après la méthode de Ziel-Neelsen et, la période de culture terminée, on pratiquait un repiquage, toujours sur le milieu usuel. Une suspension en solution physiologique, du résidu existant sur la surface du milieu de culture était ensuite inoculée dans le péritoine d'un jeune cobaye, du poids de 200 grammes.

L'autre moitié du sédiment devait servir pour l'épreuve biologique, pratiquée par injection sous-cutanée à deux jeunes cobayes, maintenus à un régime alimentaire réduit. Les animaux ainsi inoculés ont été attentivement observés pendant trois mois; on les avait placés dans deux cages séparées, et l'on contrôlait systématiquement leur poids et leur

température; après 60 jours, ils furent soumis à l'épreuve de la tuberculine (injection sous-cutanée de gr. 0,50) et, après un mois ils furent sacrifiés et autopsiés.

Resultats. — Les repiquages furent constamment négatifs; en effet, abstraction faite des tubes qui présentaient une souillure par moisissures, — souillure imputable à la préparation du milieu — il n'a été possible de déceler dans les autres, pas plus que dans les résidus du matériel cultivé, la moindre trace de développement d'une colonie, de quelque nature que ce soit.

L'examen microscopique pratiqué sur les frottis colorés du matériel provenant du raclage de la surface du milieu de culture, après différentes périodes d'incubation, et même dans l'absence d'une manifestation macroscopique quelconque de développement, a mis en évidence dans en 4 cas différents, la présence de petite amas de granules irréguliers, d'une dimension variable (de 6 à 25 μ) doués d'un certain degré d'ailleurs inégal d'acido-résistance et Gram-résistants.

A mon avis, les résultats devraient être rapprochés des résultats indentiques qui ont été le plus constamment rapportés par M. Bianchi; d'après cet A., Löwenstein estimerait qu'il s'agit d'une phase particulière du développement initial (« Anfangsstadiun ») du mycobactérium et, sur cette base, il concluerait, sans plus, à une culture positive.

Naturellement les quatres tubes qui avaient donné les résultats mentionnés ci-dessus ont été soigneusement étudiés, dans le but de déceler la nature de ces formes granuleuses.

Les cultures successives, poursuivies jusqu'à la quatrième série, tant sur milieu à l'oeuf solide (Petragnani, Hohn, Petroff), ou liquide (Besredka), que sur pomme de terre glycérinée, ou sur milieu synthétique de Proskauer, n'ont déterminé le développement d'aucun élément bacillaire; pareillement l'examen microscopique du matériel repiqué a donné, par la suite, un résultat négatif, après le deuxième repiquage.

Enfin une suspension plutôt épaisse de ce matériel en liquide de Ringer inoculée, par la voie intraveineuse, au cobaye et au lapin (dans deux cas, on a inoculé un poulet) n'a provoqué qu'un tableau morbide transitoire, avec résolution en peu de jours. L'épreuve à la tuberculine par injection sous-cutanée de 0,50 gr., a donné, 40 jours après l'inoculation, un résultat négatif. L'autopsie pratiquée après une période suffisante d'observation n'a mis en évidence rien de pathologique.

A vrai dire, une interprétation tout à fait sûre et exacte de ces résultats, même soigneusement étudiés par M. Bianchi, n'est point facile.

Etant donné l'absence de toute multiplication bacillaire dans mes expériences, on doit exclure totalement la question de germes vivants; et l'on pourrait avancer l'hypothèse d'une souillure de type aviaire, pro-

venant des oeufs employés pour la préparation du milieu nutritif; mais je crois qu'on puisse exclure également cette éventualité, car l'incubation prolongée de contrôle du milieu, avant ensemencement, n'a jamais mis en évidence de résultats positifs; d'ailleurs, l'inoculation pratiquée, même chez le poulet, n'a déterminé aucun processus pathogène pourant se rapporter à l'infection tuberculeuse.

L'hypothèse alors peut se soutenir d'une contamination par des bacilles acido-résistants, contenus dans les liquides employés pour le traitement du sang à inoculer, hypothèse qui est appuyée par les recherches de M. De Amicis et par la diffusion considérable de ces genres bacillaires dans le monde extérieur, tout récemment confirmée par Eichbaum.

Mais dans mes recherches je me suis servi de l'eau bidistillée et de récipients lavés avec cette eau et rigoureusement stérilisés, de sorte que je ne croit pas pouvoir soutenir cette hypothèse.

Il n'y aurait qu'une seule explication, suggérée par M. Bianchi, c'est-à-dire que ces petits amas de granules constatés à l'examen microscopique, puissent provenir du colorant même employée pour l'examen. Il ne faut pas oublier, à ce propos, le conseil de M. Kahn, d'être très prudents dans l'interprétation des données microscopique: les particules constituant l'enveloppe des hématies et les granulations leucocytaires sont acido-résistantes et ressemblent beaucoup au myco-bactérium de la tuberculose, soit par leur forme, soit par les cas cliniques où on les rencontre.

Or, en se basant sur les résultats que j'ai obtenus, il me semble que cette dernière hypothèse soit la plus vraisemblable et la plus proche de la vérité.

J'ai voulu insister sur ces détailes, car — ainsi que je l'ai dit plus haut — il semble que Löwenstein, s'en tienne à la simple donnée microscopique sur frottis du matériel râclé à la surface des milieux repiqués, même sans aucun développement macroscopique de culture, pour énoncer un jugement positif, en affirmant qu'un repiquage fait sur le même milieu donne naissance à une culture à développement normal.

Mes expériences, ne permettent pourtant pas de confirmer ces idées, tandis qu'elles concordent parfaitement avec les recherches que j'ai rapportées de M. Bianchi. Cet auteur n'est jamais parvenu à obtenir, des passages en cultures successives positifs, avec ce matériel, ni à déterminer chez les animaux de processus nets de nature tuberculeuse. Pour ce qui en est des inoculations simultanées du sang des sujets en examen, faites chez le cobaye, il n'a été possible de relever d'altérations pathologiques de nature tuberculeuse chez aucun des animaux traités, ni de leur vivant, ni à l'autopsie. L'épreuve à la tuberculine, par voie sous-cutanée, a toujours donné un résultat négatif. De l'ensemble de ces recherches, il

ressort donc que l'apparition d'une poussée de bacillémie (bien que sporadique et intermittente), lorsqu'on pratique un pneumothorax thérapeutique, même dans les formes cliniques ulceratives s'étendues doit être, une éventualité excessivement rare, et extrèmement difficile à démontrer, en dépit des perfectionnements de technique récemment préconisés.

Institut Climatique de la C. R. I. « Eremo di Lanzo ».

PETRAGNANI G. - **La dissociation bactérienne.**

(Relation présentée au IVe Congrès Italien de Microbiologie de Milan).

I. — NOTICE HISTORIQUE DES ETUDES SUR LES VARIATIONS (*) BACTERIENNES.

L'ère bactériologique était à son aube; on avait à peine identifié quelques microrganismes, que l'on mettait déjà en question la plus ou moins grande constance des espèces bactériennes.

Des résultats de premières expériences, il apparut à quelques chercheurs, que les influences extérieures à action lente, mais d'une longue durée, ou à action rapide, mais violente, étaient suffisantes pour changer profondément les caractères des bactéries, et, par conséquent, les espèces.

Par opposition à Cohn (1) (1875) qui avait subdivisé les schizomycètes en un système de familles et d'espèces et qui insistait sur la stabilité des types bactériens, Naegeli émit la doctrine du « pléomorphisme des bactéries », basée, ainsi qu'il l'affirma, sur des milliers d'expériences.
B. subtilis leptotrix racemosa in honorem streptotrix

D'après Naegeli (2) (1877) chaque espèce de schizomycètes pouvait en particulier, provoquer la formation d'acide lactique, la putréfaction, ou différentes maladies. Chaque espèce aurait eu la propiété de s'adapter à des conditions extérieures variables, et, par conséquent, de produire des formes différentes, avec des caractéristiques physiologiques propres. L'adaptation aurait été plus ou moins stable, selon les causes déterminantes, donnant lieu à des formes à caractères moins nettement

---

(*) Pour indiquer le phénomène de l'inconstance des caractères des bactéries, *Urkwirght* et son école introduisirent l'expression de « variation »; *Kruif* et *Hadley*, celle de « dissociation ». On les trouve toutes dans la littérature, quoique la première l'emporte sur la deuxième. Nous avons cru plus juste de préferer le terme de « variation » chaque fois que nous avons voulu exprimer le phénomène dans sa phase de formation et d'évolution, gardant le deuxième pour indiquer les manoeuvres sélectives de séparation des formes en variation.

En résumé, nous croyons que le « phénomène de la variabilité bactérienne » aie comme moyen d'analyse « la dissociation » des formes pouvant varier dans leurs caractères.

distincts, et moins constants, selon les diverses conditions extérieures. Le schizomycète lui même, en vivant dans le lait aurait produit de l'acide lactique; il aurait déterminé la putréfaction dans la viande; il n'aurait produit aucune fermentation dans la terre; il aurait provoqué l'apparition d'une maladie quelconque dans l'organisme humain. Un milieu également favorable à des transformation différentes, aurait donné lieu à la réalisation de la transformation qui répondait le mieux à d'anciennes habitudes. Des schizomycètes soumis à de fréquents changements de milieu auraient acquis des caractères incertains et auraient été capables de prendre différentes formes et de provoquer des fermentations différentes. Les points de vue de Naegeli furent partagés par Buchner, Wernich, et par d'autres encore, qui crurent avoir trouvé, dans des essais expérimentaux, la confirmation de ces points de vue.

Buchner (3) (1883), par exemple, signala quelques expériences à la base desquelles, après des variations du milieu de culture, le bacille du charbon, passerait par une forme de transition et se changerait en véritable bacille du foin (*B. subtilis*).

Dans quelques tentatives de classification, ainsi que dans celle de Zopf (4) (1882), on admettait qu'un même schizomycète pouvait apparaître sous la forme d'un coccus, d'un bacille, d'un filament, à travers des transformations que l'on croyait habituelles chez les bactéries.

Il n'est pas improbable que les théories de Lamarck et de Darwin sur l'évolution des espèces, parues au début et à la moitiè du siècle dernier, aient influencé ces premiers chercheurs dans le champ des organismes les plus simples.

Avec les progrès de la technique et des milieux de culture, les conceptions d'une grande variabilité dans les propriétés morphologiques et biologiques des schizomycètes furent réduites par leurs défenseurs mêmes. Buchner lui même, en effet, admettait plus tard, que les propriétés physiologiques des bactéries étaient assez constantes pour pouvoir servir à une différenciation de l'espèce. Mais, même lorsque l'Ecole de Koch, commença à s'imposer, quelques Auteurs persistérent, sinon à adopter le point de vue extrème de Naegeli, du moins à nier la constance de formes et de propriétés des bactéries. Un argument assez valable pour ces assertions, était le phénomène de l'atténuation ou de l'exaltation de la virulence chez quelques germes pathogènes, argument déjà connu, depuis les études de Pasteur sur le choléra des poules (1880), sur le charbon (1881), sur le rouget du porc (1882), et sur le virus de la rage (1885-1886).

Il est très intéressant, à ce moment, de se rapporter à quelques avis exprimés, avec beaucoup de subtilité et de bon sens, par Mr. Glugge (5) (1887), contre les exagérations des pléomorphystes de cette époque. Il admettait que, pour les schizomycètes comme pour les organismes supé-

rieurs, il pouvait certainement se produire, au bout d'un long espace de temps, une variation des propriétés physiologiques. Cette variation serait causée à l'origine, non seulement par l'influence directe des conditions extérieures, mais aussi par une tendance à la variation, possédée par quelques individus isolés et le plus souvent doués d'une existence éphémère. Parfois, les conditions du milieu pouvaient être telles, que ces individus, caractérisés par une anomalie de leurs propriétés physiologiques, devenaient aptes à se développer et à imprimer aussi aux autres, la même anomalie.

De cette façon, l'anomalie devenait manifeste, et, se transmettant pendant plusieurs générations, pouvait donner lieu à une variété.

Des essais favorables à la constance morphologique des schizomycètes, paraissaient avoir été faits par Van Tieghem (6) (1979), qui avait pu démontrer, dans des conifères fossiles de la période carbonifère, la présence de formes caractéristiques du bacille butyrique, et par Zopf et Miller (7) (1882) qui avaient trouvé dans le tartre dentaire de momies égyptiennes, les mêmes formes bactériennes rencontrées habituellement dans la cavité buccale.

La technique bactériologique, de plus en plus précise, apportait de nouvelles découvertes et permettait de nouvelles études fécondes en résultats. Grâce à l'oeuvre de R. Koch spécialement, et de ses élèves, on identifia les agents infectieux d'une série de maladies, et on put définir les caractères de chacun.

Pfeiffer, avec la réaction qui porte son nom, et Gruber, avec l'agglutination spécifique, ouvrirent le champ aux recherches d'immunologie, qui après le principe de la spécificité dans l'infection, posait le principe de la spécificité dans l'immunité.

Les conceptions sur la fixité de l'espèce, grâce aux points de vue de Cohn et Koch, se stabilisaient graduellement dans une série de dogmes, d'après lesquels chaque espèce bactérienne était caractérisée par le type de ses colonies et de ses cultures, par la forme des cellules et par leurs propriétés biologiques, pathogènes et antigéniques.

Toutes les formes différentes de celles qui avaient été définies comme normales furent considérées comme appartenant à des contaminations, ou à des formes de dégénérescence ou d'évolution.

Il faut cependant rappeler que Koch, tout en étant un défenseur résolu de la doctrine de la spécificité, n'avait négligé ni de prendre en considération la doctrine des mutations de De Vries, en ce qui concerne les trypanosomes (ces microrganismes qui ne présentent aucune spécificité prononcée), ni de tenir grand compte des expériences de Pasteur sur l'attenuation de la virulence du bacille du charbon.

Il écrivait (1891) en effet: « Je désirerais expliquer que je ne suis

pas, par principe, un adversaire de la doctrine de la transformation d'une espèce en une autre voisine de celle-ci, et qu'il est possible, par conséquent, que des organismes pathogènes puissent se transformer en saprophytes et vice-versa; du moment que pour le bacille du charbon on en a eu la claire démonstration, je considère ce fait comme vrai; mais pour d'autres transformations je demande des démonstrations aussi solides ».

Une conception de pléomorphisme, tel que l'avait conçu Naegeli, fut remise sur le tapis, par Filandro Vicentini, médecin des Abruzzes. Celui-ci, dans des Mémoires présentés à la R. Académie Médico-chirurgicale de Naples (1890-92-93-1901), communiqua les résultats de ses longues études sur un microrganisme, qui vit indéfiniment sur les dents, et dénommé par lui même: « leptotrix racemosa ». Il le définit comme une formation lichénoïde, c'est-à-dire une symbiose entre une algue et un hyphomycète. D'après Vicentini, les bactéries ne seraient pas des organismes indépendants, mais elles dériveraient toutes de la *lepotrix racemosa* n'étant que des particules détachées de celle-ci. Ces particules, douées du pouvoir de se multiplier pour leur compte, pourraient prendre des formes et des aspects variés, diverses aptitudes biologiques, selon le milieu, et les conditions dans lesquelles elles se trouvent éventuellement.

Les études de Vicentini, citées et rapportées d'abord par des revues étrangères, furent recueillies et publiées, dans une édition *in honorem* par l'Ordre des Médecins de la Province de Chieti en 1926.

Piccioli (8), cette même année et récemment (1931), a revendiqué la priorité pour Vicentini, au sujet d'un travail de Tissot (1926) sur la dérivation des bactéries. Tissot, dans un très important ouvragre, présenté à l'Académie de Sciences de Paris, et résumant les résultats de nombreuses recherches personnelles, arrive à conclure avec Vicentini, que les bactéries ne sont pas des organismes indépendants, mais des élements dérivés des mousses, par suite de la segmentation des filaments très très fins de celles-ci.

Très démonstrative, pour l'argumentation que nous sommes en train d'exposer est l'idée exprimée par M^{r}. Belfanti (9), en 1892, au cours de quelques observations sur le B. du tétanos adapté à l'aérobiose; « en étendant un peu le cercle étroit, où nous étions immobilisés, nous pouvons reconnaître qu'un même microrganisme peut présenter différentes fonctions. Tout cela nous démontre combien cette immutabilité de l'espèce, telle qu'on l'a comprise jusqu'aujourd'hui » est variable et élastique.

Dans le châpitre du pléomorphisme bactérien peuvent encore rentrer les recherches de Vernoni (10) (1932) sur un bacille isolé du pus d'une poche pyélonéphritique. Ce bacille outre qu'il présentait un polymorphisme morphologique et cultural remarquable, donnait origine à des formes globuleuses ne possédant pas les caractèrs de spores et que l'auteur

considéra comme des éléments du cycle vital du germe. Pour Sanarelli (11) (1927) les associations fuso-spirillaires seraient produites par une même souche qu'il appelle lui même « Héliconéma Vincenti ». Favilli (12) (1929), en étudiant un spironème, a confirmé le point de vue de Sanarelli et a décrit un cycle vital divisé en deux périodes: pendant la première, le spironème se présenterait sous la forme de bacilles, de vibrions, de spirales et de filaments; dans la deuxième, il prendrait la forme de granules. Enfin M.e Morelli, parle aussi dans ses expériences (13) (1930) de constatations personnelles de pléomorphisme. Elle décrit un *streptotrix*, qui, cultivé en aéro-et anaérobiose donnerait des formes schizomycètiques.

***

La possibilité de modifier les propriétés d'un germe, au point de permettre la transformation d'une espèce en une autre voisine, se retrouve fréquemment dans les publications.

Lehmann et Neumann (14) (1896) ont admis que dans le groupe *micrococcus*, dans celui du Bac. *pneumoniae* et du B. *acidi lactici*, dans celui du Bac. *lactis sporogenes* et dans le groupe *pyocianeus* et *fluorescens*, de nombreuses espèces admises n'étaient, très souvent, que des expressions de la variabilité d'une seule espèce. Nous trouvons encore des allusions à ce type de variabilité chez Sanarelli (15) (1893) pour les vibrions simili-cholériques; chez Kossel et Kolle et chez Kruse (cités par Hadley) pour le vibrion cholérique (souches· VI); chez Gruber et Firtsch (14) (1888), pour le vibrion de Finkler et Prior.

Gasperini (16) (1895) admit l'identité du B. de la tuberculose avec l'*Actinomices alba;* Nocard (18) admit la transformation des b. tuberculeux des mammifères en b. aviaires et vice-versa; Nang admit celle du bacille du type bovin en b. aviaire; Ferran (20) (1906) la transformation du b. de Koch en saproph te et d'un saprophyte en bacille tuberculeux.

Des résultats qui peuvent aussi trouver des points de contact avec cette argumentation, me semblent être ceux de Concetti (21) (1901) qui étudia la forme actinomycosique du bacille de la diphtérie; ceux de Martoglio (22) (1899), de Valenti (1900) et de Casagrandi (24) (1901-1903), qui jugèrent qu'en modifiant les conditions vitales de milieu, quelques germes peuvent se transformer de saprophytes en pathogènes.

Des résultats vraiment intéressants, puisqu'ils sont déjà appuyés par de nombreux contrôles, semblent être, ceux qui démontreraient la transformation du B. typhique en B. paratyphique du B. paratyphique en B. Gärtner (Sobernheim, et Seligmann (25) (1911)), des streptocoques hémolytiques en *B. Viridans* (Schnitzer et Munter) (26) (1923); des vé-

ritables B. diphtériques en B. pseudo-diphtériques (Bernhardt) (27) (1915), Semitz (28) (1927).

R. Müller (29) (1911) aurait vu se former, sur gélose au ramnose, des colonies filles, semblables entr'elles, provenant aussi bien de colonies mères de B. typhiques, que de B. pseudodysentériques.

Schmitz (30) (1917) de cultures d'un bacille dysentérique particulier, isolé par lui même (Schmitz-bacillus), aurait vu se former des bactéries des espèces suivantes.

1) *Groupe Ruhr:*

a) bac. Shiga-Kruse;
b) bac. pseudodysentérique H.

2) *Groupe typhus:*

a) bac. typhique;
b) bac. paratyphique B.

3) *Groupe Coli:*

a) Coli commun;
b) Coli paragglutinable;
c) Coli mutable.

4) *Bactéries mal déterminées:*

a) bactéries pseudo-Ruhr, non agglutinables et non absorbantes;
b) faecalis-alcaligenes-pseudo;
c) parathyphique-pseudo avec production d'indol.

Schmitz exclut la possibilité de contaminations et admet que dans le bacille d'origine se trouvent en puissance toutes les formes du groupe Ruhr-typho-Coli, et qu'au moyen de « processus sexuels » celles-ci peuvent être mises en évidence.

Une variabilité si prononcée, d'après cet Auteur, pourrait être attribuée à un échange de génération (« Generations-wechsel »). On doit remarquer que Gotschlich, en rapportant les données de Schimtz, conseille de les accepter avec beaucoup de réserves.

Zironi (13) (1919) remarqua une mutation particulière du B. du charbon (B. anthracis-colisimile) qu'il attribua à des mutations analogues à celles de De Vries. Le même A. (32), l'année suivante, en examinant le problème de la culture du bacille de la lèpre, émettait l'hypothèse que ce germe se présentât sous divers aspects morphologiques, selon leur état parasitaire ou saprophytique.

Sanfelice (33) (1920-21-24-25) aurait réussi à transformer des germes acido-résistants sans pouvoir pathogène en germes pathogènes, et vice-versa.

A l'état de mutation tel que le conçoit De Vries, sont rapportées

par Capone (34) (1919) ses observations sur les germes du groupe typho-paratyphique cultivés dans des bouillons à réaction différente.

Scarpellini (35) (1924), en remarquant dans un vibrion du choléra des modifications selon le milieu où celui-ci vivait, admit que les phénomènes remarqués auraient pu être l'équivalent d'une fécondation isogame selon les données de Schaudinn.

Les caractères de paratyphique B acquis par le B. typhique à la suite d'un traitement pur du sérum agglutinant, furent considérés par Lusena (36) (1926) comme des phénomènes de mutation. Ce même changement, d'après Bonicelli (37) (1927), serait aussi arrivé à la suite de passages en bouillon. D'après Gerbasi (38) (1925), le B. d'Eberth pendant le passage à travers l'organisme des malades, sous l'effet de facteurs humoraux, peut prendre les caractères du paratyphique et du B. *Coli.*

Marassini (39) (1919), en cultivant dans des milieux acides et alcalins des germes du groupe typho-paratyphiques-coli-dysentériques, remarque des modifications dans les propriétés agglutinantes; il y voit le mécanisme par lequel plusieurs variétés peuvent dériver d'un seul germe. Alberto Ascoli (40) (1921) aurait eu la démonstration de bac. dysentériques typiques, qui se sont graduellement changés en *B. Coli.* Dans de nombreuses études, Favilli (41) a recherché les relations existantes entre les différentes espèces de Brucelles, et il en a conclu que celles- ci sont une variété d'un germe unique. Les points de vue de ce dernier ont été confirmés aussi par Bonicelli (42) (1927) et par De Antoni (43) (1929). Alessandrini, Sabatussi (44) (1931) et Pampana (45) (1931), par la réaction à la trypaflavine, confirment également l'opinion de Favilli, en attribuant à des dissociations les divers aspects des Brucelles.

Si les études et les recherches que nous venons de mentionner, peuvent, plus ou moins, se rapporter au problème des variations et des dissociations bactériennes, elles ne peuvent pas cependant être confondues avec les recherches, qui, par un nouveau procédé analytique, ont amené à la constitution de ce nouveau et très important chapitre de la bactériologie.

Les premières et véritables contributions expérimentales parurent en 1906 et en 1907, lorsque Neisser (46) et Massini (47) publièrent leurs observations sur les mutations du *B. Coli.* Ces études, d'une importance manifeste, étant confirmées par Kowalents (48) (1910) déterminèrent une nouvelle orientation dans les recherches sur la variabilité bactérienne. A la littérature botanique, on emprunta dans le champ de la variabilité bactérienne le terme de « mutation », que De Vries avait introduit pour indiquer les variations brusques discontinues, et d'une grande ampleur.

Ce terme de mutation, fut, en effet, employé par Neisser et Massini et par d'autres auteurs; mais il a été très discuté et abandonné ensuite

par beaucoup d'autres parce que l'existence d'un cycle sexuel n'ayant pas été démontré chez les bactéries, un tel terme ne pourrait pas exprimer la signification que De Vries lui a attribuée.

Après les observations sur les mutations du *B. Coli*, des auteurs anglais et allemands ont particulièrement fourni d'importantes contributions aux études sur la variabilité, posée, par eux mêmes, comme le problème direct de leurs recherches.

Les travaux d'Eisemberg (49) sur la variabilité de divers germes ont paru d'une très grande importance. Dans sa revue, et dans ses admirables recherches, il tenta d'analyser les divers types de variation et de les classer selon leur signification: en modifications, en fluctuations, et en changements permanents. Avec Eisemberg, nous pouvons citer Bernhardt (27) qui, en 1915, introduisit de nouvelles conceptions inhérentes au problème de la dissociation, ainsi que nous la comprenons aujourd'hui.

Différents chercheurs remarquèrent d'infinies variations culturales et morphologiques; il y eut en même temps des études sur les variations considerées dans leurs rapports avec les propriétés fermentatives, d'après les directives indiquées par Neisser et Massini. Ainsi, nous trouvons dans la littérature anglaise les travaux de Penfold (50) (1910-1911) de Ledingham (51) (1918) et de leurs collaborateurs; dans la littérature allemande, nous trouvons les travaux de Reiner Müller (29) et d'autres auteurs. Ces études de Müller et de Penfold sont importantes par les renseignements qu'elles apportent sur les colonies filles, et leurs modifications dans le groupe typho-coli-dysentériques.

Weil et Felix (52) (1917) publièrent leur travail sur le *Proteus X* (19) et, avec l'observation des formes H et 0; ils lièrent indirectement les réactions immunitaires au problème des dissociations microbiennes.

Avec l'étude des variations, par rapport aux réactions sérologiques et fermentatives, on continua celle concernant les variations des aspects morphologiques et culturaux.

En 1918, parut le travail de Baerthlein (53) qu'on peut considérer, comme classique. Baerthlein, avec une méthode soigneusement détaillée, analysa les variations des colonies de 14 espèces bactériennes. Il démontra que les variations qui concernent la morphologie cellulaire, la production de pigments, la production de dépôts, les réactions fermentatives et sérologiques et la virulence sont strictement liées entre elles.

Hadley (1*) affirme que Baerthlein est le premier auteur qui ait mis clairement en lumière, l'importance de l'instabilité bactérienne, et qui ait enrégistré de nombreuses données très importantes que nous pouvons facilement interpréter aujourd'hui dans le tableau des phénomènes de la dissociation bactérienne. L'importance de la contribution apportée par

Baerthlein, à l'étude des variations bactériennes, a été reconnue aussi par Arkwright.

Les études de Arkwright (54) (1921) ont marqué un nouveau stade dans l'évolution des recherches sur les variations bactériennes. Cet auteur a le mérite d'avoir identifié, parmi les colonies offrant des variations du groupe typho-coli-dysentériques deux types de colonies; l'un, désigné par lui même par la lettre R (de «rough» = rugueux), l'autre par la lettre S (de «smooth» = lisse). De ces types R et S, Arkwright décrivit les caractéristiques, morphologiques, les propriétés culturales et biochimiques, ainsi que les rapports sérologiques; il en discuta la signification par rapport à l'hypothèse de la mutation. Gorini (55) qui, en 1902, avait déjà remarqué des variations physiologiques chez certains *cocci* de la flore mammaire, en même temps que Arkwright et que De Kruif, fut parmi les premiers à mettre en évidence le processus le dissociation microbienne spontanée, par ses recherches sur les ferments acido-protéolytiques.

Arkwright et Goyle (56) publièrent ensuite, en 1924, leurs intéressantes études sur les rapports entre les formes R et S du groupe typho-dysentériques, avec les formes H et 0 de Weil et Felix.

Plus récemment Stewart (1926-1982) en reprenant les conceptions déjà exprimées par Schaudinn (57) (1902), et par Dotell (58) (1908) sur l'autogamie, a émis une théorie sur le cycle vital des bactéries, théorie qui servirait à expliquer les phénomènes de variation et de dissociation.

Une très nombreuse série de travaux, touchant le problème des dissociations bactériennes, s'est accumulée dans la littérature étrangère de ces toutes dernières années, et les notions acquises les plus importantes seront examinées dans la suite de cet exposé.

Dans notre Pays, les études se rapportant directement à ce sujet n'ont pas été très nombreuses.

Ilvento (60) (1911), d'une souche de vibrion isolé de l'eau, obtint, en gélatine, deux types de colonies: un liquéfiant et tout à fait semblable à celui de Koch; l'autre terne, jaunâtre, non liquéfiant, qui par isolements successifs sélectifs reproduisaiait les deux formes de colonies.

Neri (61) (1912) décrivit un vibrion cholérique, qui, tout en restant virulent, montra una perte spontanée et durable de sa mobilité et de ses cils.

Izar (62) (1916) remarqua des variations morphologiques, culturales et biochimiques du *Micrococcus* de Brucce dans des milieux additionnés de quinine, et, ensuite (63) (1926), il remarqua encore des variations du même germe cultivé sur gélose glycérinée et sur gélose glucosée. Gorini (55) par des recherches sur la thermobiose, sur les cultures ascendantes ou grimpantes, sur les formes filtrantes et migrantes, du *Mammococcus* a apporté de nouvelles contributions au problème de la dissociation.

Boggetti (64) (1930) a obtenu des formes R et S de quelques souches du groupe des microbes intestinaux, réunis dans le genre *Castellanus* par Cerruti (6).

Alessandrini et Sabatucci (41), Sabatucci et Pampana (45), ont introduit la réaction à la trypaflavine, qui peut être utile puisqu'elle sert à reconnaître les formes R des souches dissociées.

Les contributions de Seppilli et Guiso (66), et de Seppilli et Denes (67), à l'étude de la phase R des protophytes; l'étude des récepteurs 0, des *métasalmonelle* aviaires de Cilli (68); les recherches de Spinelli (69) sur les réactions aspécifiques des phases S et R dans le groupe des Brucelles, sont de cette année même.

II. — Principales theories sur les variations bacteriennes.

Dans le châpitre de la variabilité bactérienne, on peut ranger une quantité de phénomènes, qui peuvent être très différents entre eux, tant par leur apparence extérieure, que par leur essence intime. Il est donc opportun, avant de rapporter les théories avancées par chaque auteur en particulier pour expliquer les causes et le mécanisme génétique de la variabilité bactérienne, d'en rappeler d'abord, en résumé, les théories principales.

Une première distinction doit être faite entre les variations qui permettent d'acquérir de nouvelles propriétés « plus-varianti » et les variations qui ont pour conséquence la disparition d'un des caractères typiques de l'espèce bactérienne en question « minus varianti ».

Dans le cas des « plus-varianti », on ne peut nier qu'il s'agisse de retours de propriétés, qui, après une période d'activité, avaient ensuite disparu.

Pour Gotschlich (2*), il n'existe pas dans le règne des bactéries un seul cas, sûrement démontré dans lequel on ait réussi à obtenir un agent infectieux d'un type bien déterminé provenant de la transformation d'un saprophyte d'une espèce voisine. Pourtant beaucoup d'auteurs ont jugé possible cette transformation, et j'ai déjà abordé la question dans le chapitre précédent. Je rappelerai maintenant que Uhlenhuth et Zuelzer (70) ont reussi à transformer, par un procédé exempt de critique, un spirochète d'eau sans pouvoir pathogène en un spirochète pathogène.

On trouve les « minus-varianti », beaucoup plus souvent ques les « plus-varianti »; aussi bien dans un cas que dans l'autre, non seulement des propriétés isolées peuvent varier, mais aussi un véritable ensemble de caractères fonctionnels. On en trouvera pour preuve les formes des colonies R et S, les bactéries virulentes transformées par les méthodes de Pasteur en vaccins, la forme bacillaire si discutée provenant de la

régénération de l'ultravirus tuberculeux, qui d'après quelques uns n'est pas tubercoligène ni susceptible de culture, etc. En certains cas, on peut aussi avoir en même temps la suppression de quelques fonctions, et l'apparition, d'autres fonctions nouvelles « minus-plus-varianti ».

Les variations peuvent aussi être distinguées, par rapport à leur durée, en permanentes et temporaires. Ces dernières sont beaucoup plus fréquentes que les premières.

La division la plus importante cependant est celle qu'on peut faire en prenant en considération les diverses causes apparemment génératrices des variations. On trouve ainsi deux grands groupes:

1) Variations spontanées, à causes internes.

2) Variations provoquées, à cause externes.

Il est bon de déclarer d'abord, qu'en réalité, cette division n'est pas absolue et qu'on la doit surtout la considérér, comme un schéma à adopter pour faciliter l'exposition du sujet.

Les variations spontanées à causes internes sont essentiellement celles que l'on peut mettre en évidence au moyen de simples procédés sélectifs, sans modifier le milieu où se trouvent les bactéries. Très instructives sont les expériences avec le *B. prodigiosus*: d'un bouillon de culture récent on peut obtenir le développement en plaques de deux ou plusieurs variétés, diversement pigmentées, qui montrent (au moins en partie) un tendance continuelle à se transformer d'une forme dans l'autre. Des variétés pigmentées analogues ont été observées par Beiferinck (71) Eisenberg (49) Daddi (72) etc. sur des souches diverses.

Par rapport à la morphologie de la colonie, Arkwright a décrit deux types fondamentaux R (rude), et S (lisse). Sans nous étendre pour le moment sur cet argument qui sera traité en détail plus loin, nous devons faire remarquer que ces types de colonies paraissent avoir un caractère universel. C'est à dire que le même type de dissociation semble se manifester de même façon chez des souches bactériennes appartenant à des espèces tres différentes les unes de autres (groupe typho-coli, charbon, choléra), jusqu'à donner l'impression que cette même forme de dissociation intéresse presque tous les germes, et peut-être toute cellule vivante (Hadley).

Dans ces cas, où l'ampleur des variations demeure constante et en rapport avec les manifestations vitales habituelles de l'espèce bactérienne, les variations mêmes font partie des caractéristiques de l'espèce et ne peuvent pas être considérées comme des déviations de la normalité (Gotschlich). Même Andrewes et Wislow (cités par Gotschlich) par suite de l'existence latente possible de diverses tendances évolutives, innées, définissent l'espèce comme un « centre de variations ».

Aux variations spontanées à causes internes appartiennent aussi les altérations (Toenniessen) (73) caractérisées par le fait que d'un certain type se détache toujours un type de variation déterminé: par exemple, les variations du *B. coli* de Neisser et Massini et les phénomènes observés par Toenniessen sur le *B. pnemoniae* Friedländer.

Une autre forme de variation à causes internes est celle qui consiste dans l'acquisition de nouvelles propriétés ou dans la perte de caractères typiques de la part d'une souche bactérienne déterminée, acquisition ou perte qui surviennent brusquement et qui sont durables, et irréversibles. Ces variations, qui sont les plus fréquentes parmi celles à causes internes, peuvent être distinguées surtout parce que, fréquemment elles présentent un caractère tout arbitraire et indépendant de l'action stimulante qui les a provoquées. Comme nous le verrons, la génèse et l'interprétation de cette forme particulière de la variabilité sont très discutées. En effet, en admettant que l'on ait affaire aux souches pures, descendantes d'un seul individu (« Klon » c'est à dire descendance végétative d'un seul individu, « Reine Linie ») il s'agit d'interpréter les causes et les modalités de la transmission aux descendants d'une altération qui s'était réalisée chez un ancêtre lointain, sous une influence indéterminée. On trouve des exemples de variations soudaines dans le cas de certaines souches de charbon rendues asporogènes d'une manière définitive.

On a désigné par le terme de mutations, au sens où l'entend De Vries, des variations qui se présentent par intervalles, qui sont durables ou seulement difficilement réversibles, et qui possèdent une direction indépendante de celle qui serait normalement indiquée par le facteur déterminant. Mais nous avons dit que par le terme de mutation (dans le sens utilisé par De Vries), on arrive à affirmer l'existence d'une altération génotypique, dont en bactériologie on ne peut pas avoir des épreuves sûres, la réproduction croisée manquant complètement.

Gotschlich proposerait, donc, d'appeler ces variations tout simplement « Klonwänderungen », c'est à-dire, altérations d'un « Klon ». Il est à remarquer, tout de suite, que ces variations, même si elles se présentent sous l'action d'un facteur externe, sont à classer parmi celles, provenant de causes internes, soit parce qu'elles se perpétuent dans leurs descendants soit qu'on l'interprète comme un réveil des tendances évolutives latentes sous l'action d'un facteur externe.

Les influences externes agissant sur les variations sont très nombreuses (physiques, chimiques, biologiques, telles que la bactériophagie et l'antagonisme etc.): celles ci ont un caractère temporaire prononcé, et elles sont réversibles. Dans la plupart des cas, les variations de ce genre représentent une adaptation au facteur stimulant déterminant. Par exemple, des germes cultivés dans un milieu contenant un certaint sucre,

qui normalement n'était pas attaqué, par ceux-ci acquièrent graduellement la propriété de le dissocier; des germes qui deviennent hémolytiques par des passages chez l'animal (choléra) (Mühlens et Raven) (74): staphylocoques et streptocoques, (Schnitzer et Munter) (75), Pulvermarcher (76); des germes qui, cultivés en milieux secs et pauvres, réduisent leur appareil ciliaire: *Proteus X* 19 (Braun et Salomon) (77).

Ici, il est opportun de rappeler que l'on obtient généralement et que l'on met en évidence les variations à causes externes, en associant la sélection aux facteurs déterminants externes.

La sélection peut se produire, spontanément, par la prépondérance dans la culture de ces germes qui se sont adaptés le mieux aux nouvelles conditions de vie, ou bien on peut l'obtenir artificiellement, par des procédés techniques (isolement en plaques, isolement obtenu en se servant de la différence d'aptitude des germes à s'étaler sur les milieux (Gorini) (55).

Un exemple où tous les individus d'une même culture se modifient en même temps, dans le même sens est celui des cultures de *B. prodigiosus*; tous les germes, par entraînement progressif, ou par passage *in vivo* (Bertarelli) (78), deviennent capables de former du pigment d'une manière homogène à 37° C. Pour des cas semblables, Beijerinck a proposé le terme de formation physiologique d'espèce («physiologische Artbildung»).

Nous avons dit un mot plus haut du fait que les variantes à causes externes sont, souvent, des adaptations au facteur stimulant. Nous devons remarquer maintenant, qu'il n'est pas possible d'établir une classification entre les variations, en prenant comme critérium de distinction le fait qu'elles sont, ou non, la conséquence du facteur stimulant. Il y a, en effet, beaucoup de cas où une action stimulante bien définie peut être suivie d'une variante en sens opposé, ou bien, tout à fait désordonnée (par exemple Marks, cité par Gotschlich, a vu que l'adaptation à l'arsenic des paratyphiques peut produire des altérations dans l'agglutinabilité).

Les variations à causes externes sont essentiellement des modifications qui altèrent les caractères typiques d'une culture, soit dans un sens progressif (en apportant de nouveaux caractères) soit dans un sens régressif (en supprimant quelques uns de ceux-ci).

Ainsi que nous l'avons déjà dit, on reconnaît habituellement les variations à causes externes, à leur état provisoire (modifications simples). Parfois, cependant, à cause de la prolongation de l'action stimulante, il peut arriver que celles-ci persistent, pendant un temps plus ou moins long, ou même indéfiniment (toujours dans les limites de nos possibilités d'observation). On aurait alors des variations qui, avec un terme employé par Jollos (79) pour les variabilités des protozoaires, devraient être dé-

nommées « modifications durables ». Ces dernières peuvent difficilement se distinguer de ces formes de variations à causes internes, qui consistent dans la transmissions héréditaire d'une modification apparue brusquement.

Les modifications durables, ainsi que toutes les variations à causes externes, seraient caractérisées par un rapport évident, proportionnel entre l'intensité et la durée de l'action stimulante, et l'entité et la persistance des altérations correspondantes. A un facteur stimulant faible ferait suite une altération légère; en augmentant cette action, on obtiendrait une altération du même ordre que la première, mais plus profonde. Dans les variations à causes internes, au contraire, ou bien on ne trouve pas ce rapport, ou bien on le trouve beaucoup moins marqué. Pensons, par exemple, que la transformation définitive des streptocoques hémolytiques en *viridans*, peut se produire par un seul passage de trois heures dans la cavité péritonéale de la souris (Schnitzer et Munter) (26). En ce cas, la variation se produit à la suite d'un séjour tellement court dans l'organisme animal (le temps strictement nécessaire à la reproduction de 6-9 générations de germes inoculés) que sa nature spontanée, et interne, est bien évidente.

A propos des modifications durables, V. Loghen (80) fait remarquer la contradiction qui existe dans ce terme même: dans la génétique, on désigne comme modification une altération en rapport avec le milieu; mais, si cette modification persiste indépendamment des conditions externes, elle cesse d'être une modification. Une modification ne peut pas se transmettre héréditairement, fut ce même pour peu de temps, puisqu'on devrait supposer une adaptation préalable des dispositions génotypiques, qui est précisement opposée aux conceptions de la génétique.

***

Après cette exposition de faits, nécessairement sommaire, nous devons maintenant considérer les théories, qui ont été formulées au cours des diverses années quant au mécanisme génétique et aux causes de la variabilité.

Au commencement de notre rapport, nous avons déjà mentionné les théories de Naegeli, Zopf etc. qui soutenaient l'existence d'un pléomorphisme illimité des bactéries. Ces théories manquant d'une base expérimentale certaine (puisqu'on ne connaissait pas encore la technique des cultures pures) étaient le résultat de considérations spéculatives. Elles tombèrent fatalement avec les recherches précises de R. Koch et de son école, qui imposèrent leur solide doctrine de la spécificité des agents infectieux.

Malgré l'absolutisme des lois de la spécificité, on commença bientôt

à remarquer des phénomènes de variation même dans les cultures pures. Ce furent, les recherches de Pasteur et de ses élèves sur l'atténuation artificielle des germes pathogènes, pour en obtenir des vaccins; vinrent ensuite les expériences sur la transformation du virus varioleux en virus vaccinal (rapportées par Gotschlich), celles sur les bactéries productrices de pigment (Schottelius) (81) Wasserzug (82), puis les premières observations sur la variabilité spontanée, ainsi que l'apparition des variations brusques signalées par von Gruber et Firtsch pour le vibrion de Finkler-Prior, etc.

Mais toutes ces observations démeurèrent décousues, tant que l'ouvrage de De Vries « Die Mutationlehre » et le renouveau d'intérêt que prirent de ce fait les questions de l'hérédité, n'attirèrent pas l'attention sur la possibilité de processus évolutifs et de transformations, même dans le monde des bactéries.

Il est nécessaire ici de déblayer le champ de notre discussion, de beaucoup de ces phénomènes que nous avons désignés sous le nom de modifications simples.

Dans de très nombreux cas de « minus varianti » nous nous trouvons, en particulier, en présence d'altérations passagères de la partie somatique du protoplasma bactérien; celles-ci ne durent que peu de temps et disparaissent avec la cessation des conditions de milieu, qui en avaient provoqué l'apparition. Des variantes semblables sont accidentelles et d'une importance relative, puisqu'elles correspondent à une capacité d'adaptation qui est physiologiquement le propre de tous les organismes vivants.

Quelques « plus, ou minus varianti » peuvent, au contraire, représenter respectivement, le retour de propriétés démeurées latentes (ainsi que des phénomènes d'atavisme d'après Beijerinck, cités par van Loghem), ou bien la disparition de caractères accessoires, apparus dans des circonstances accidentelles. C'est, en effet, à présumer dans les cas d'acquisition ou de perte de la mobilité, et dans les cas d'oscillations de virulence de beaucoup de germes appartenants à des groupes qui comprennent des espèces pathogènes et des espèces saprophytes (les diplo-streptocoques, les B. diphtériques etc.). Ces phénomènes, dans lesquels on entrevoit le jeu de dispositions spéciales, et plus encore ces phénomènes qui sont réunis dans le groupe des variations à causes internes, présentent un véritable intérèt et ils ont été étudiés davantage. C'est à ceux-ci que nous nous rapporterons particulièrement, quand nous tâcherons d'évaluer la complexité des notions acquises jusqu'ici sur la variabilité et sur leur intérêt pour le chercheur et pour le médecin.

En dehors du terme de mutation, après Neisser et Massini (*B. coli* mutable) a été largement employé celui de « mutant », afin d'indiquer la variation obtenue. On a parlé de mutations progressives et de mutations

régressives etc.; mais ces termes ont été employés par les divers auteurs afin de désigner des faits d'une portée très différente. En outre, le terme de mutation, étant lié à un complexe de phénomènes héréditaires, est impropre aux bactéries, pour lesquelles il n'y a pas encore actuellement de démonstration d'une reproduction sexuelle.

Les autres expressions proposées « idiovariation » (Siemens) « génovariations » (Schmitz), etc., voulant indiquer une altération de l'idioplasma de la cellule bactérienne, présentent également des inconvénients, et moins de précision.

***

Laissant de côté les théories sur un cycle évolutif possible des bactéries, deux hypothèses fondamentalement différentes entr'elles, ont été avancées par E. Gotschlich et par v. Loghem afin de résoudre le problème de la variabilité. Gotschlich insiste sur le fait que, pour une même espèce bactérienne, les variations spontanées et celles à échéance, ne surviennent pas d'une façon tout à fait irrégulière, ni en nombre illimité, ni dans un sens tout à fait arbitraire; mais que celles-ci se manifestent et se développent dans un circuit à limites assez bien déterminées (dissociation du *B. prodigiosus* chez des races également pigmentées, d'après divers auteurs, sur des souches différentes: expériences sur le *B. fluorescens* et sur le *V. colerae* de Nyberg, Baerthlein, Eilesenberg).

L'existence de pareilles possibilités fut expliquée en supposant dans la cellule bactérienne la préexistence, de divers états d'équilibre avec passages de l'un à l'autre (Blaringam, Nyberg).

Dans les cellules bactériennes, il préexisterait en somme, une quantité de dispositions qui, normalement, constituent entr'elles un équilibre. Il peut arriver que, pour une raison quelconque, cet équilibre se rompe et qu'une de ces entités héréditaire l'emporte alors sur l'autre, ou bien que celles-ci alternent entr'elles, ainsi que le croit Toenniessen pour le phénomène décrit par lui même sous le nom d'« alternation » (alternance).

Gotschlich, prenant en considération toutes ces remarques, a élaboré une théorie chimio-structurale de l'origine des variations à intervalles et spontanées. Par analogie avec le phénomène connu en chimie sous le terme d'isomérie, dû au fait que des composés chimiques peuvent avoir plus d'une formule, Gotschlich admet une structure automère du plasma vivant.

Dans les cellules bactériennes, on trouverait donc, deux ou plusieurs dispositions structurales, qui pourraient s'alterner entr'elles, de façon durable, ou bien amener à la formation de variations stables. Il y aurait

encore une autre analogie avec les phénomènes d'ordre physique ou chimique, dans le fait, déjà remarqué par Beijerinck et Toenniessen, que le dernier caractère acquis est aussi le premier à rétrocéder. Cela s'accorderait avec la règle des degrés d'Ostwald, d'après laquelle un système chimique ou physique, qui peut exister dans différentes conditions d'équilibre, rétrocède graduellement, en passant de l'état le moins stable « métastable » à celui toujours le plus stable.

Van Loghem trouve qu'une interprétation « génétique » de la variabilité bactérienne présente de grosses difficultés. En effet, deux parmi les plus importants phénomènes de variation demeurent en contraste évident, avec les données sur l'hérédité et la variabilité chez les organismes supérieurs: d'abord la modification durable, qui devrait représenter une adaptation temporaire de la disposition génotypique; en second, la transformation expérimentale de la disposition génotypique (dans les cas les plus suggestifs de variation), qui signifierait l'hérédité de propriétés acquises.

Ce contraste entre la signification des faits observés dans l'étude de la variation et les termes empruntés à la génétique pour les désigner, n'a pas été sufisamment considéré par les bactériologues. Van Loghem ne croit pas justifié de rechercher les causes des variations d'après les règles de la génétique et de l'hérédité; on ne peut évidemment pas comparer un organisme supérieur qui se reproduit au moyen d'éléments sexuels, avec une cellule bactérienne, qui se reproduit végétativement.

Dans le complexe biologique constituant un « Klon » aucune en particulier des cellules bactériennes, qui le constituent, ne peut se comparer à un individu supérieur: les cellules descendantes de cellules originaires, se divisent chacune en deux éléments nouveaux, qui héritent non seulement de la disposition génotypique, mais aussi d'une partie du soma de la cellule précédente. Dans la descendance il y a donc, une perpétuation somatique de la cellule originelle. Le « Klon » comprend donc:

1) L'hérédité de la constitution génotypique.

2) La modification probable du génotype (mutabilité).

3) Le phénotype (c'est-à-dire la réaction du génotype au milieu exterieur).

4) La possibilité de variation de l'individualité.

On devrait donc, plus justement, prendre en considération les variations bactériennes comme l'expression d'altérations de l'individualité, c'est-à-dire comme des modifications, du « Klon ». Elles ne rentrent pas dans la génétique, mais dans la physiologie et dans la pathologie des bactéries.

À l'appui de cette hypothèse, Van Loghem cite quelques exemples

de la vie des organismes supérieurs: la modification des fonctions digéstives de l'homme, qui s'adapte à des aliments de nature variée, les altérations durables à caractère négatif ainsi que les mutilations, les atrophies, les dégénérations, quelques altérations endocriniennes (développement excessif du système pilifère etc.). En partant de ce point de vue, cet auteur est porté à juger les variations bactériennes comme des relations entre l'individualité bactérienne et les facteurs stimulants, normaux et anormaux, du milieu. Par exemple les « Klons » de B. du charbon rendus asporogènes pourraient être comparés à des individus qui eussent perdu les yeux dans leur jeunesse: on devrait parler pour cela de mutilation et non pas de mutation. Une pareille interprétation pourrait être aussi valable pour les pertes définitives de la virulence, de la chromogénèse, du pouvoir de fluidifier la gélatine etc.

Les « plus varianti » bactériennes sont considérés par v. Loghem comme des retours ataviques, qui n'ont rien affaire avec les transformations des disposition gènotypiques. En résumé, les altérations de l'individualité, pourraient être divisées en: 1) alterations évolutives (réaction des facteurs stimulants normaux; 2) altérations régressives, qui, à leur tour, se distinguent en atrophies et dégénérescences.

Van Loghem, ne nie pas qu'il se produise chez les bactéries des processus héréditaires; cependant, les variations que nous étudions devraient être considérées, comme des réactions physiologiques et pathologiques des individus bactériens, et, par conséquent, ces phénomènes devraient être, avant tout, précisés et mis en lumière pour étudier ensuite les altérations génétiques qui peuvent éventuellement en résutter.

Toute une autre école d'auteurs a voulu voir dans les phénomènes de variations, le témoignage d'un cycle évolutif des bactéries.

***

Le premier à édifier une espèce de cycle de développement des bactéries a été Almquist (83) qui, pour les bacilles typhiques et pour les vibrions du choléra, décrivit des formes renflées, interprétées comme des fructifications et des formes de développement. En étudiant les modalités de l'agglutination, il crût aussi remarquer des rapports entre le B. typhique et « Ruhr » mais, en réalité, les phénomènes décrits rentrent parmi ceux de la paragglutination.

Vernoni et Fichera (84) rapportent un cycle vital, analogue sur une souche de spironème, isolé d'un ganglion mésenterique d'une jeune chèvre.

De même, Fuhrmann et Hort (85), et particulièrement, Lönis (86), ont décrit des cycles vitaux chez les bactéries. Pour ce dernier auteur les bactéries existeraient dans une phase organisée et dans une phase

amorphe « symplasma »; dans la phase organisée celles-ci se reproduiraient, non seulement par division, mais aussi au moyen d'organes spéciaux: 1) gonides; 2) corps régénératifs et ectospores; 3) arthrospores, microcystes; 4) endospores. Löhnis a aussi décrit une union directe de deux ou plusieurs cellules bactériennes, qui le produirait dans les jeunes cultures, avant la constitution des organes de reproduction.

Dans l'hypothèse compliquée échaffaudée par Löhnis, la description de formes filtrables chez les bactéries est d'un intéret particulier; elles seraient représentées par une partie des gonides.

Mais Enderlein (87) qui s'est beaucoup occupé du pléomorphisme et de la sexualité des bactéries, assure que la morphologie des bactéries n'a rien à voir avec leur cycle évolutif.

D'après Mellon (88), les bactéries sont des champignons possédant des Conidies, des asques et un cil sexuel.

Comme nous l'avons déjà vu, même Schmitz a admis chez les bactéries, l'existence d'un cycle vital; à certaine phase, on aurait des phénomènes sexuels de conjonction, et des descendants très différents entr'eux. D'une importance particulière sont les études de Stewart et celles de Kuhn et Sternberg sur les « Petten Koferien » dont nous nous occuperons dans une châpitre à part.

Pour Stewart le cycle vital des bactéries se compose de deux stades: l'un de multiplication asexuelle, et l'autre de reproduction autogamique. D'un repiquage frais, d'une bactérie quelconque, sur une plaque de gélose, naissent des colonies dont le développement n'est pas indéfini; il s'arrête à une taille qui est fixe pour chaque espèce bactérienne. Jusqu'à ce point le développement se produit par multiplication asexuelle, et ensuite, chez les germes sporogènes commence la formation des spores. L'auteur rapporte qu'avant la sporulation, chez quelques grandes bactéries sporogènes (Butschli, Sporonème, Flexilis), on a des processus qui ressemblent à une conjonction entre deux cellules soeurs (autogamie): par exemple, dans le B. flexilis, il se forme une cloison transversale qui se résorbe; ensuite, les granules de chromatine des deux moitiés, disposés en rangées parallèles au plus grand diamètre du bacille, se mêlent par des mouvements ondulatoires, et se réunissent pour former une spirale allant d'un pôle à l'autre du corps bactérien; enfin, des extrêmités renflées de cette spirale, les spores prennent leur origine. Schaudinn interpréta ces phénomènes comme des processus de conjonction autogamique. Chez les bactéries plus simples ces processus de conjonction ne sont pas si évidents, mais l'auteur déduit leur existence d'une sèrie d'observations Entre autres faits, il est très important de constater que dans les bactéries sporogènes et non sporogènes, l'apparition des colonies filles n'a lieu que lorsque le développement de la colonie mère a cessé; mais, si l'on

limite la multiplication asexuelle (par des ensemencements surabondants), on constate l'apparition précoce des colonies filles. Chez les espèces sporogènes les colonies filles proviennent des spores.

La phase critique coinciderait avec la conjonction autogamique; celle-ci consiste dans la formation de spores et de races filles.

Plus la période de multiplication sexuelle s'abrège, plus la phase critique apparaît hâtivement. Au contraire, en renouvelant continuellement, par des repiquages quotidiens, la période de multiplication asexuelle, on parvient à retarder parallèlement l'apparition de la phase critique.

Stewart distingue les variations bactériennes en mutations véritables, et en mutations de type adaptatif, mendélien.

Laissons de côté les premières; cet auteur prend en considération particulière les deuxièmes, à l'origine desquelles l'intervention de deux facteurs serait nécessaire: l'un externe, l'action stimulante du milieu) et l'autre interne (la phase critique). Le facteur externe pour être efficace, doit agir pendant la phase critique.

Pour démontrer la forte ressemblance des variations avec les phénomènes mendéliens, l'auteur apporte l'exemple du coli « mutabile » d'autres bactéries, chez lesquelles, d'une forme mère instable, et incapable de produire la fermentation d'un certain sucre, proviennent régulièrement deux formes filles: l'une instable et semblable à celle originaire; l'autre stable et capable de déterminer la dite fermentation. D'après Stewart, cette succession d'éléments divers, ne peut être comprise qu'en admettant l'existence d'un hétérozygote, duquel puisse dériver un homozygote, régressif. Mais, parmi les phénomènes mendéliens, on trouve des différences, entre les êtres plus élevés et les variations bactériennes. D'abord, la variation chez les bactéries est l'adaptation à un facteur stimulant externe, tandis que chez les êtres plus élevés elle dépend de la production d'allélomorphes dans les gamètes, et de la réunion de ceux-ci, d'après les lois du cas envisagé. Ensuite, les variations bactériennes ne sont pas complètes, au moment de cette conjonction supposée, et elles demandent de nombreuses divisions asexuelles successives pour devenir manifestes. On peut expliquer ces différences en pensant, à la façon différente dont se fait la reproduction chez les êtres plus élevés et chez les bactéries: chez les premiers, on a l'union de deux gamètes isolés dont chacun porte les allélomorphes de son géniteur et les gamètes se rencontrent selon les lois de chaque cas. Chez les bactéries au contraire, les allélomorphes se trouvent réunis dans une membrane cellulaire unique, et, si des facteurs externes n'interviennent pas, leur union se fera de la même façon que précédemment. L'organisation différente de la chromatine peut aussi entrer en jeu pour expliquer l'aspect particulier des phénomènes mendéliens chez les bactéries.

En résumé, Stewart, décrit chez les bactéries un cycle évolutif dans lequel alternent une phase de reproduction asexuelle et unes phase de reproduction autogramique. Pour qu'on puisse avoir une des variations que l'auteur appelle fréquentes et régulières (c'est à dire qui se produisent régulièrement dans des conditions bien établies), et qu'il définit de type mendélien, il est nécessaire que le facteur déterminant intervienne après la phase de reproduction asexuelle.

Cette théorie développe la conception de variation dans un sens héréditaire, en l'amplifiant et en la complétant par la description d'un cycle évolutif des bactéries; de cette façon, elle réunit et harmonise en soi même, beaucoup des hypothèses formulées.

L'opinion que les variations se conjuguent avec un cycle vital des bactéries, a été acceptée même par Hadley. Arkwright, au contraire, fait remarquer que, si cette hypothèse peut être justifiée dans le cas de variantes qui se repètent très fréquemment (et aussi invariablement que pour les formes R et S du B. dysentérique), elle n'est plus soutenable dans le cas de variantes qui se fixent et ne montrent qu'une tendance nulle ou insuffisante à la réversion.

La plupart des variantes, d'après l'opinion de cet auteur, devraient être considérées comme les extrémités des rayons d'un cercle, plutôt que comme les points d'une circonférence.

III. — Les facteurs de la variation bacterienne.

L'étude du phénomène des variations bactériennes a commencé par l'examen de ces formes variant d'une façon spontanée, au cours de recherches qui s'étaient proposées un autre but initial.

Nous avons dit: d'une façon spontanée, parce que c'est ainsi qu'on a l'habitude de présenter ces cas dans la littérature; mais, à proprement parler, une telle variation spontanée chez un être agamique, nous porterait à admettre une force contraire à la conservation de l'espèce, une sorte d'activité biologique intrinsèque de la bactérie, indépendante de toute autre cause externe, et ne trouvant aucune base dans les lois connues en biologie.

C'est ainsi que les premières observations accidentelles, n'ont pas été approfondies par des recherches analytiques appropriées ayant pour but de déterminer la part de ce phénomène due à des facteurs inhérents à l'activité vitale des microrganismes, ni la part due aux facteurs résultant du milieu. Aujourd'hui encore, en se placont d'un point de vue objectif il est difficile de séparer en connaissance de cause ce qui dans le phénomène revient à l'une ou l'autre part.

Lorsqu'on parle des bactéries, on connait bien peu de la structure

intime de leur protoplasma, et, moins encore, comme nous l'avons vu plus haut, de ce qui détermine les processus de reproduction. La conception de la scission amitotique, avec sa simplicité, est là pour indiquer seulement, que nous la séparons du phénomène reproductif des cellules émanant d'un véritable noyau, au sens propre; mais rien ne nous autorise a croire démontré que dans le corps des bacteries il manque une partie spécifique, dont la fonction est de transmettre les caractéristiques héréditaires de l'espèce.

De cette ignorance est nécessairement dérivé l'empirisme dans la recherche des facteurs extérieurs qui peuvent concourir a modifier les caractéristiques de la bactérie, par l'action de causes supposées d'ordre extérieur. Une fois individualisées, ce sont elles qui on servi de base à toutes les hypothèses explicatives des processus évolutifs, avancées par Schaudinn (57) (1902-1903), Dobell (58) (1908) et Stewart (59) (1926-1927) etc.

L'apparition « spontanée » de modifications, en réalité, ne peut pas être expliquée sans une condition favorable du milieu ambiant.

Même si nous examinons une culture unicellulaire, de B. typhique, ou de choléra, par exemple, nous devons penser que ce n'est qu'apparemment que les conditions sont égales pour tous les élements qui la composent. En dehors du moment différent du développement, il faut considérer aussi, les différences de contact avec l'air et avec la lumière de divers points de la culture.

On sait bien, en effet, que, plus ou moins tôt, se forment des individus morphologiquement inégaux. Dans une même culture de B. typhique on peut trouver un bacille long de 15 microns et un autre seulement de 1 micron; nous savons, aujourd'hui, qu'une telle disparité morphologique est caractéristique des cultures qui s'apprêtent à subir les phénoménes de dissociation. L'inégalité anatomique entre les divers corps bactériens établit une condition particulière d'inégalité sensitive aux facteurs externes. La masse protoplasmatique de l'un étant différente, de celle de l'autre, elle ressentira un même facteur externe, d'une façon bien différente.

L'importance évidente du milieu dans le déterminisme des variations bactériennes, a attiré pendant cette dernière période, l'attention des chercheurs, qui, de toutes les manières en ont recherché l'action.

Selon Arkwrigth (3) le phénomène de la « variation » est causé par les influences externes sur l'élément bactérien. La grande surface de la cellule bactérienne, et sa rapidité de multiplication en comparaison de sa masse, en font parmi les êtres vivants, la plus sensible, même à une action stimulante minime.

Gotschlich, rappelle à ce propos, que cette rapidité ee multiplication amène, parfois en 24 h., parfois en moins de temps encore, à produire

48 générations. C'est à dire que dans une culture de 24 h. d'une bactérie, se succèdent des phénomènes qui (en calculant à 30 ans la vie moyenne de l'homme), auraient demandé chez l'homme même: 1500 ans pour se produire. Dans une culture de 12 h. les mêmes phénomènes d'assimilation, d'accroissement, et de reproduction se répètent 22.000 fois.

Il apparaît, donc, manifeste comment, les conditions de milieu contiennent en puissance, les facteurs propres à exciter les processus de dissociation.

De la même façon que, pour le développement de bactéries différentes, il est nécessaire d'utiliser des substances et des conditions différentes, nous pouvons croire pareillement, que des facteurs ou actions stimulantes différents puissent être indispensable pour obtenir la variation d'espèces bactériennes différentes. Mais, ainsi qu'un même milieu de culture et les mêmes conditions permettent le développement d'espèces différentes, ainsi un même facteur stimulant peut avoir une action suffisante sur des individus de groupes micboliens divers. Par contre, le même facteur agissant sur des souches différentes de la même espèce bactérienne ne produit pas, sur toutes, les mêmes effets. Il existe donc, une individualité de souche, même dans les réactions dissociatives. Quelle est la raison de cette différence d'aptitude à la dissociation pour différentes souches d'une même espèce bactérienne, et quelle est la raison pour laquelle, celles-ci, se dissocient? Ces faits pourraient être expliqués, en partie, par l'hypothèse suivante de Stewart, dont nous avons déjà mentionné les conceptions au sujèt du cycle vital des bactéries:

« Lorsqu'un facteur stimulant particulier exerce son action sur des bactéries en coincidence avec la phase critique, il en résulte des variations d'un caractère mendelien modifié; le même facteur s'exerçant à n'importe quel autre moment du cycle vital de la souche ne produit aucun effet ».

Dans sa monographie, en effet, l'auteur anglais, par une série d'experiences, démontre comment un coli mutabile, mis en contact avec du lactose, n'acquière pas la propriété de le fermenter, si l'on empêche l'apparition de la « phase critique» par des repiquages quotidiens. Mais, si le lactose est ajouté pendant la phase critique, près des colonies de coli « mutabile », et en pleine croissance sur des géloses non sucrées en plaques, il est capable de provoquer des variations après une brève période d'action.

Les démonstrations de Stewart, qui présentent sans doute un certain interêt, méritent des études plus étendues et plus approndies que celles faites jusqu'ici. L'hypothèse d'une phase critique nous apparaît une bonne suggestion, par ce fait que, sans celle-ci, on comprendrait difficilement le mode d'action de facteurs même modestes, qui font sentir leur influence

non seulement sur le phénotype bactérien, mais aussi sur le génotype. On ne pût penser à une modification qu'en admettant une phase, pendant laquelle l'idioplasma serait particulièrement influençable.

En poussant la discussion de tels problèmes de la biologie intime des microrganismes, nous ouvririons un champ riche en hypothèses, mais pauvre en données sûrement objectives. Dans ce paragraphe, au contraire, il convient de s'en rapporter aux facteurs stimulant les phénomènes de la dissociation bactérienne. En établissant notre relation sur ce sujet, nous nous rapporterons d'abord aux données existantes dans la littérature, et pour une part moindre, aux résultats de nos expériences personnelles. Nous n'avons pas l'intention, (et d'ailleurs cela ne nous serait pas possible), de passer en revue toutes les observations recueillies dépuis 50 ans. Nous citerons, seulement les exemples plus démonstratifs et plus significatifs, en suivant les directives de Hadley (1).

À cet effet, il est nécessaire, de faire une certaine classification des arguments, afin de faciliter ce qui pourrait être un coup d'oeil permettant de saisir l'ensemble de la question. Nous pouvons distinguer des facteurs stimulants physiques (température, tension d'oxygène, rayons ultraviolets, migration à travers les bougies poreuses), chimiques (antiseptiques, couleurs, sels), culturaux (vieillissement des cultures sur des milieux liquides et solides, « starvation » ou régime de disette sur milieux pauvres, volume du milieu, réaction du milieu), biologiques (passage par animal), sérologiques (sérum normal, sérum immun).

Il est certain que nous devons apprécier avec des critériums de relativité assez large, l'action particulière de tel ou tel facteur stimulant dans le déterminisme dissociatif de telle ou telle espèce bactérienne. Il faut aussi tenir compte qu'en cette matinèe on n'agit pas avec des méthodes ni des éléments « standardisés »

Facteurs physiques.

Température. — En cultivant les divers germes à leur « optimum » de température, le développement s'effectue d'une façon régulière. De faibles oscillations sur ce point, n'apportent pas des modifications bien appréciables des microrganismes, tandis que les grands écarts thermiques, en plus ou en moins, influencent d'une façon plus du moins remarquable la biologie de ceux-ci.

On doit les premières observations sur l'attenuation du B. anthracis par développement à 42°,5 aux études de Pasteur (1881) et de Chamberland et Roux (1883). Laurent (1890) montre la même action sur la production du pigment du B. rouge; Kiel, Wilson, Coplans et Adami (cités par Hadley) montrent l'action sur les réactions fermentatives.

On doit aussi l'attenuation de la virulence du B. anthracis et des agents pathogènes en général, dépendant sûrement de la température de culture, à l'action associée de l'oxygène atmosphèrique. Puisque nous ne pouvons pas séparer avec certitude un facteur de l'autre, pour plus de simplicité d'interprétation nous nous rapportons, à celui qui paraît être le facteur déterminant le plus actif.

Bail (90) démontra l'effet de la température sur la possibilité du B. anthracis de s'encapsuler, et Preisz (91) démontra l'apparition de colonies particulières mucoïdes du type intermédiaire entre les formes S et R. Bail et Flaumenhaft (92) (1914-17«, en exposant ce bacille à 42° isolèrent des formes diverses de colonies, parmi lesquelles quelques une reconnaissables pour des formes R et S (« alpha » et « béta » de Bail). Récemment, Katzu (93) a mis en èvidence l'influence des hautes températures sur la production de colonies secondaire particulières, même dans le charbon.

Roux et Yersin (94) (1890) en cultivant des souches virulentes de bacille diphtérique, entre 39°,5 et 40° C. obtinrent des cultures avirulentes, semblables aux pseudodiphtériques. Une telle modification des propriétés pathologiques était accompagnée par des modifications de développement en bouillon, par des activités fermentatives modifiées parallèlement, et par une atypie des cellules. Ces résultats furent à nouveau confirmés par Hewlett et Knight (95) en chauffant, à 45 C°, des souches virulentes, pendant 17 h,

Weil et Felix (52) (1916) Hirzchfeld et Zajdel (96) (1924) et d'autres auteurs ont démontré la dissociation HO du Proteus *X* 19 sous l'action de la chaleur (42° C.). La même action entraine des dissociaitons sérologiques dans le pneumocoque et dans le streptoccoque.

Yoshioka (97) (1922), en cultivant à 39° C. les trois types « standard » de pneumocoques virulents ,obtint des variantes culturales et sérologiques qui représentent des types R. On obtint de semblables résultats avec un streptocoque d'Aronson.

Reddish (98) (1927) sur 19 souches de Botulinus, isola de 17 d'entre elles un microrganisme qui avait les caractéristiques culturales et fermentatives du B. sporogenes. Hadley, en commentant ce travail de Reddish, juge que ce fait ne doit pas être attribué à une contamination des cultures examinées, ainsi que l'auteur lui même, le croyait; le B. sporogenes ainsi obtenu n'est pour lui, en réalité, que le forme R du type normal de Botulinus. Hadley explique donc cette variation par l'action de la chaleur habituellement employée par les bactériologistes americains pour l'isolement de ce germe.

Dans le groupe typho-coli-dysenteriques, nombreuses sont l'observations de phénomèmes dissociatifs provoqués par la chaleur, qui conduiraient à l'apparition, plus ou moins précoce, de types R (Hadley).

Récemment Soule (99) (1932) a démontré que dans le groupe des sporogénes aérobies (B. mycoïdes, B. megantérium, B. mesentericus, et B. cereus) la dissociation de la forme S vers le type mucoïde (M.) est plus forte, lorsqu'on provoque le développement entre le 45°-50° C.

La chaleur a été aussi employée pour stabiliser les souches dissociées; nous voyons ainsi que Zlatogoroff (100) (1930) et d'autres emploient dans ce but, le chauffage des cultures à 45° (pour le B. d'Eberth).

Tension d'oxygène. — Il y a bien peu à dire sur l'importance de l'oxygène vis-à-vis de la variabilité bactérienne, car les obsérvations à ce sujet sont insuffisantes.

Casagrandi (24) (1898-1901) fit remarquer de quelle manière la virulence de quelques germes pathogènes, et particulièrement, celle d'un streptocoque et de quelques vibrions voisins de celui du choléra (isolés des fécès du cobaye) disparaissait rapidement, dans des conditions d'anaérobiose très prononcée, ou d'aérobiose.

Ces remarques peuvent être rapprochées des expériences de Pasteur, sur l'atténuation du virus du choléra des poules, et du virus de la rage; d'autres expériences citées dans le paragraphe précédent, peuvent se rapprocher de la production des vaccins charbonneux par l'action de la chaleur.

Hadley (1*) rapporte que Soule et Novy remarquèrent des changements particuliers dans les caractères culturaux chez le B. malleus lorsque l'oxygène des cultures sur gélose inclinée était réduit à la proportion de 0,1%. De telles études ne furent ni continuées ni achevées; on ne peut donc pas affirmer s'il s'agissait d'une véritable dissociation proprement dite. Morishima (101) (1931) rapporte que dans 4 souches de B. typhique cultivées par lui même en anaérobiose, les colonies filles apparaissaient en 3-5 jours, au lieu de 8 jours en aérobiose.

Il est aussi intéressant rappeler les observations de Vaudremer (102) qui obtint des cultures modifiées, non virulentes, de B. tuberculeux par cultures profondes non glycérinées dans du bouillon de pomme de terre. De même, nous avons observé dans notre Laboratoire, que si par des soins spéciaux nous cultivons le B. tuberculeux dans la profondeur de tubes de bouillon glycériné ou de liquide de Sauton, dans des conditions, donc, d'oxygénation insuffisante, lorsqu'on provoque de nouveau le développement en surface, on a la formation d'un voile mince. Il paraîtrait donc, en général, que les cultures de type R poussent mieux en anaérobiose partielle; celles-ci, se recueillent en effet dans le fond du tube de culture. Mais il est plus vraisemblable que ce fait soit dû à la précipitation des flocons des cultures autoagglutinées.

Dans le cas d'essais dissociatifs de V. du choléra, en ensemençant

le bouillon avec des colonies du type R nous avons toujours obtenu, en surface, le développement d'un voile résistant, qui dans quelques cultures acquèrait un caractère de couenne; de sorte que dans ce cas la forme R serait bien specifiquement aérobie.

Wreschner (103) (1921) remarqua que la réversion de la forme R du tétragène, dans la forme S se produisait en 24 heures dans la proportion de 25% lorsqu'elle était cultivée dans du bouillon sérum exposé à l'air, tandis qu'elle ne se produisait absolument pas en anaérobiose.

Hadley (1) a trouvé que la formation des colonies secondaires R est moins courante dans les tubes de gélose inclinée bouchés avec de la cire à cacheter, que dans ceux laissés à l'air libre.

Rayons Ultra-Violets. — Les observations faites dans ce champ ne sont qu'en petit nombre.

Nous trouvons qu'en 1914 Mr. et M.me Henri (104) obtinrent deux variétés de B. anthracis, en faisant agir les rayons-ultra-violets, sur une émulsion de ce germe. Une forme α caractérisée par des formes diplococciques, Gram +, et une forme β à filaments minces et à chaînes courtes, Gram —. Les deux types possédaient aussi des propriétés culturales et fermentatives différentes.

Je mentionnerai aussi les études de Nadsohn, Lacassagne, Eberth et Perez (citées par Zlatogoroff au Congrès International de Microbiologie de Paris de 1930), dont cependant je ne peux préciser les résultats.

Toda et Tadao ont récemment signalé que les rayons-ultra-violets facilitent la dissociation des formes R et S dans les suspensions de B. tuberculeu soigneusement préparées.

Migration à travers les bougies poreuses. — Par suite des ses expériences sur les « virus migrants » et « non migrants » à travers les bougies poreuses (1931), Petragnani (105) a employé cette méthode comme un stimulant des phénomènes dissociatifs.

Il a pu remarquer qu'en pratiquant des isolements sélectifs, aux premiers instants où l'on remarque que la migration s'est accomplie, il est facile de dissocier des formes variées. Par ce procédé l'auteur a dissocié des souches mobiles des B. Flexner et Shiga, des formes H du B. prodigiosus et des micro-colonies des Br. melitensis et abortus.

Facteurs Chimiques.

Antiseptiques. — Les premières connaissances sur l'action modificatrice des substances antiseptiques sur les microrganismes remontent aux origines de la bactériologie. Toutes les anciennes et nombreuses

observations que nous connaisons à ce propos peuvent maintenant trouver leur place dans le grand chapitre de la variabilité.

En 1888, nous avons par exemple les études de Guignard et Charon (106) sur le bacille pyocyanique. Ils démontrèrent que ce germe, dans les bouillons additionnés de produits nuisibles (acide borique, thymol, etc.) selon la nature et la dose de l'antiseptique, se présente sous la forme de bâtonnets quelque peu plus longs que les formes normal filamenteuses et flexibles, et en forme de spirilles.

Une des substances le plus communément employées a été le phénol. Ainsi Chamberland et Roux réussirent par ce moyen, à modifier la virulence du charbon; Malvoz (108) (1892) transforma le bacille coli en B. typhique, ou en un germe très proche du celui-ci; Villinger (109) (1894) put reconnaître que l'acide phénique modifie la morphologie et la motilité du bac. coli, mais sans arriver à le transformer en b. typhique.

Arkwright et Goyle (56), White (110), Goyle (111), Braun et Salomon (77), Braun et Schaeffer (112) ont souvent employé l'acide phénique (par exemple, de la gélose phéniquée à 0,17% pour provoquer la dissociation HO du Proteus X19.

Arkwright et Goy.e (56) (1924) signalent avoir augmenté la fraction S dans des cultures mixtes S. R. de B. enteritidis, typhosus et dissentericus, par l'emploi du phénol.

Lommel (113) (1926) a transformé le B. communior en B. coli, par emploi du formol.

Sels. — A ce propos nous devons encore rappeler les expériences de Chamberland et Roux (107) qui obtinrent des souches asporogènes et avirulentes de charbon en exposant le B. anthracis à l'action du bichromate de potassium, en dilution 1 : 2000. En 1883 Toger (114) et en 1893 Pinna (115) obtinrent des cultures modifiées de charbon, par l'emploi du chlorure de sodium et de l'eau de mer.

Revici (116) (1922), en étudiant manière de se comporter du B. anthracis sur des milieux contenant de l'acide arsénieux, remarqua que le germe produisait des colonies avec les caractères de celles du staphylocoque, où les éléments bacillaires pouvaient être courts ou longs et même en forme de cocci disposés en amas ou en chaînes Gram-négatifs.

Mazzetti (117) (1928) en cultivant dans du bouillon de Löffler additionné de 0,6% de bichromate de potasse une souche de charbon très virulente, a obtenu une souche asporogène et peu virulente.

Eisemberg a obtenu des résultats semblables, en employant de simples passages dans des bouillons glycérinés.

Möhler et Wasoburn (118) produisirent des variations du B. diphtérique en employant le trichlorure d'iode.

Penfeld (50) (1911-1912) a démontré que lorsque les organismes type coli poussent sur des milieux contenant de l'acide chloroacétique, ils perdent leur pouvoir de produire des gaz, par attaque des hydrates de carbone; tandis que le B. enteritidis Gaertner, cultivé en contact avec l'acide chloro-acétique, perd le pouvoir de produire des gaz par attaque des pentose, tout en le gardant pour les exoses.

Penfeld rapporte encore que le monochloroacétate de Na excite les processus dissociatifs du B. typhique, et Burnet (119) remarqua la production d'un haut pourcentage de la forme R dans le B. typhique cultivé dans du bouillon additionné d'oxalate.

Egalement intéressantes sont les études de Wolf (120) (1909) sur l'influence de quelques sels, dans la production du pigment du B. Prodigiosus, de la Sarcine lutea, du staphylocoque albus et aureus.

Il obtint, par exemple, quelques espèces rouges foncées et blanches de B. prodigiosus, au moyen de passages en série, dans des bouillons contenant, soit du permenganate de potasse, soit du nitrate de cadmium soit du chlorure de mercure soit du bichromate de potasse.

Matzuschita (121) (1900), en faisant pousser des microrganismes divers dans de la gélose contenant 5,3, 10% de chlorure de sodium, remarqua que ceux-ci prenaient des formes et des aspects culturaux inusités. Quelques cocci donnèrent naissance à des filaments ou à des bacilles, et beaucoup de bacilles produisirent ou le longs filaments ou des formes en cocci géantes, ainsi qu'on l'observe dans les cultures qui évoluent vers les premiers stades du processus dissociatif.

Izar (67) (1916) obtint des modifications morphologiques, culturales et sérologiques, de la Br. mélitensis au moyen de passages répétés, sur des milieux contenant des doses croissantes de sels de quinine. De Antoni (43) (1929) aurait vu que la Br. mélitensis se change en paramélitensis, lorsqu'on ajoute au bouillon de la plasmo-quinine.

Le chlorure de lithium aussi doit être compris parmi les activants des processus dissociatifs. Hoffstadt et Youmans (122) (1932) obtinrent des types R et un type « G » filtrant, d'une souche virulente de Staphylococcus aureus.

Mallmann et Gallo (123) (1932) en employant du bouillon avec 1% de chlorure de lithium obtinrent des formes R de souches S de Br. abortus, de Br. suis et de Br. melitensis.

Couleurs. — Déjà depuis longtemps on attiré l'attention sur l'influence des substances colorantes sur les bactéries. Il est certain que la plupart des auteurs a pris en considération la propriété d'adaptation de divers germes, à ces substances d'action antiseptique bactériostatique, et, incidemment, ils furent amenés à constater les changements provoqués

par celles-ci. On a remarqué en effet des changements provoqués par diverses couleurs dans les activités fermentatives, dans les propriétés culturales, dans les facultés d'agglutination et dans la virulence.

On peut, maintenant réunir dans un même paragraphe ces observations, dans le chapitre des variations.

Le groupe typho-coli, a été spécialement étudié à cet égard. En 1906 Löffler (124) décrivit 4 nouveaux types de B. coli, produits par l'emploi du vert de malachite. Deux de ceux-ci peuvent être facilement reconnus comme des types R. En 1912-1913 Revis (125) en étudiant l'adaptation du B. coli au vert de malachite, et au vert brillant, remarqua que dans les cultures en plaques contenant ces substances se développaient aussi deux types différents de colonies, qui, par leurs caractères culturaux et fermentatifs, représentaient certainement les types R et S. Lommel (113) rapporte que le vert de malachite à une influence particulière sur l'inhibition du pouvoir de fermentation pour le lactose du B. coli, qui acquiert des propriétés analogues à celles B. d'Eberth.

Pierguidi (126) (1930), en cultivant une souche de 5. coli dans des milieux additionnés d'acide rosolique a remarqué que cette substance est capable de faire perdre au B. coli la propriété de produire de l'indol et de produire des gaz par attaquedes sucres.

On pourrait encore citer d'autres nombreux auteurs, surtout dans les pubblications antérieures à 1921, qui ont obtenu des changements dans les bactéries, en les soumettant à l'action des couleurs; mais, très souvent, les descriptions de ces auteurs sont telles que nous ne pouvons pas y reconnaître des phénomènes se rattachant avec certitude à des processus dissociatifs.

Les études de Cowan sur le streptocoque; celles de De Kruif et Webster sur le Bac. lepisepticum; celles de Griffith, de Reimann et Amoss sur le pneumocoque; celles de Petroff, Branch et Steebken sur le B. C. G. et sur le B. tuberculeux, datent de cette année.

Ces derniers auteurs attribueraient au violet de gentiane une action excitante sur la dissociation en colonies R et S, possédant des dégrés divers de virulence, tant pour le B. C. G. que pour le B. tuberculeux.

Excitants en cultures.

Vieillissement des cultures et produits du métabolisme bactérien. — On doit à Firtsch (116) (1888) les premières observations sur les variations se manifestant dans de vieilles cultures en bouillon sur gélose ou en gélatine. Celles-ci furent confirmées et développées par Baerthlein (53) dans ses nombreuses études sur la variation des colonies (1918).

Cet auteur, après avoir ensemencé les plaques de gélose, faisait dé-

velopper les colonies pendant 24 h. à 37°, et il les laissait vieillir ensuite à la température ordinaire, pendant quelques jours ou quelques semaines.

Dans ces conditions, il obtenait la production de colonies filles marginales ou centrales, qui représentent fréquemment un type plus ou moins évolué.

Baerthlein, en outre, en pratiquant des ensemencements sur gélose en partant de vieilles cultures en bouillon obtenait directement deux, ou même plusieurs types de colonies.

Parmi les divers types décrits par Baerthlein nous pouvons reconnaître ceux qui sont connus aujourd'hui sous le nom de R. S et O. Des méthodes analogues ont été employées par Preisz (91) pour le B. du charbon, par Feiler (127) pour le B. proteus, par Arkwrigt (54) pour le groupe typho-dysentérique, par Weil et Felix (52) pour le proteus etc. etc.

De l'ensemble de ces essais, il paraît confirmé par tous les expérimentateurs que le vieillissement est un facteur poussant l'évolution vers la forme R. Dans notre laboratoire, par exemple, par vieillissement des bouillons de culture, de 4 souches (sur 6 examinées), Vanni a obtenu des types R du B. coli.

Les vieilles cultures sur gélose sont moins aptes que celles en bouillon à mettre en évidence des phénomènes dissociatifs; cette observation concorde aussi avec le fait, déjà remarqué par Beijerinck (71) et par Eisenberg (49) sur la plus grande stabilité microbienne en milieux solides.

Dans notre laboratoire, Buonomini (129) en examinant de vieilles cultures sur gélose de 28 souches typhiques, n'a pu isoler des formes R que de trois seulement.

Il est certain, et particulièrement dans les cultures en milieux liquides, que l'accumulation des produits du métabolisme bactérien, par leur vieillissement, constitue, comm'il a été déjà reconnu par Baerthlein (53) et Gildemeister (130), une action tendant à favoriser la dissociation.

Rosenthal (131) (1926) a obtenu des races asporogènes de bacilles du charbon, en cultivant ce germe dans des filtrats de vieilles cultures (tant sporogènes qu'asporogènes). De ce fait se rapprochent les études d'Emmerich et Low (132) (1889) sur l'action des filtrats du B. pyocyanique, celles de Malfitano (133) et de beaucoup d'autres, sur les filtrats de cultures du B. anthracis. Une certaine action peut, en outre, s'expliquer, par les produits du métabolisme, et par le protplasma même des bactéries d'une autre espèce que celle en examen. Martoglio (22) (1899) réussit à rendre pathogènes 5 pseudo-typhiques, 1 pseudo-coli, 2 b. pseudo-diphtériques, 1 b. pseudo-tuberculeux, par des passages en milieux contenant respectivement: des produits solubles et insolubles du bac. d'Eberth et du B. coli; de la toxine diphtérique et des protéines du B. de Löffler; de la seconde tuberculine de Koch.

Reed (134) (1932) a remarqué que la dissociation du B. C. G. en colonies R et S est stimulée lorsqu'on ajoute au liquide synthétique, où la souche est en train de se développer, une émulsion de germes R tués par la chaleur. Les cultures associées, avec leurs phénomènes complexes d'antagonisme, d'antibiose, de synergie, etc. ont été généralement observées sous un point de vue autre que celui de la dissociation; à la lumière de ces études, les associations bactériennes présentent un champ très suggestif et intéressant d'observations ultérieures.

Dans notre laboratoires de Sienne, en cultivant de nombreuses espèces bactériennes dans le bouillon de cultures tuberculeuses de développement déjà avancé, nous avons pû apprécier pour quelques unes d'elles une tendance plus marquée par rapport aux témoins, aux phénomènes dissociatifs.

Le B. proteus X 19 par exemple, donne une dissociation H—→O presque complète, qui dans la culture similaire de contrôle ne se produit pas d'une façon si prononcée; le B. prodigiosus présente une plus ample variété de types.

A propos de l'action des produits métaboliques de germes d'espèces diverses, nous devons rappeler les études de Isabolinski (135) (1913) qui démontra comment la pyocyanase exerce une action antibiotique sur la plupart des microbes qui deviennent immobiles et montrent des formes d'involution.

Vaudremer (136) (1913) démontra que le B. tuberculeux perd sa virulence lorsqu'il est mis en contact, pendant 24 h. à 39°, avec un extrait filtré d'Aspergillus fumigatus.

Sanarelli (11) (1927) rapporte qu'en cultivant l'Heliconema Vincenti, sur un filtrat de culture de B. mesentericus, celui-ci prend la forme d'un véritable bacille fusiforme.

Cultures sur milieux solides et liquides. — Les milieux de culture peuvent avoir une grande influence sur les processus biologiques des microrganismes. Les observations de Guignard et Charron (106) de Metchnikoff, de Karlinski (138), démontrant comment un même germe, selon les milieux nutritifs où il est cultivé, peut prendre des aspects variés, remontent à 1888-89-94.

Grâce aux observations de Penfold, confirmées par Arkwright et par De Kruif, nous avons appris que les milieux liquides constituent un milieu particulièrement propice aux phénomènes dissociatifs.

Récemment, Soule (139) (1928) a montré que, tandis que le type S du B. subtilis est très stable sur gélose, la dissociation se produit rapidement dans les cultures en bouillon.

L'humidé du milieu aussi a une certaine importance: un milieu sec,

est ordinairement plus propice à la stabilité, qu'il s'agisse de cultures R ou S. Cette constatation s'accorde avec les observations déjà citées par Beijerink et Eisenberg.

Inversement, la présence d'une quantité insolite d'eau de condensation, au fond d'une culture sur gélose inclinée, peut déterminer des variations. Eisler et Silberstern (140) (1921) démontrèrent que les cultures des B. typhique sur gélose humide et sur gélose sèche donnaient respectivement des types de cultures différentes au point de vue antigènique. De rapides repiquage en bouillon simple, augmentent ordinairement le nombre des formes du type S et peuvent causer une réversion du type R pur (Jordan, 141) (1926).

Feiler (127) (1920) trouva que 18 passages rapides d'une souche R de typhus, déterminèrent une transformation en type S, tandis que 25 passages sur gélose inclinée ne déterminèrent aucun changement de la culture R. Dans notre laboratoire, Buonomini(129) (1932) par 25 passages quotidiens en bouillon de 7 souches typhiques, a pu observer une augmentation de la proportion du type S.

Pampana (45) (1931) et Alessandrini et Sabatucci (14) (1931) au contraire, ont obtenu par cette méthode, une augmentation de la fraction R, qu'ils ont rendue manifeste par leur réaction à la trypaflavine.

Mazzetti (142) (1932), par des répiquages de 12 en 12 heures en bouillon, a obtenu la dissociation R ⟶ S du B. anthracis, tandis que des repiquages semblables sur gélose ne lui ont donné aucun résultat.

Il semble aussi que la masse du milieu de culture présente quelque importance.

Hadley (1*) soutient que si l'on emploie deux quantités différentes de milieu nutritif, l'une petite et l'autre beaucoup plus grande, le dégré de dissociation est plus fort après un certain temps, dans le grand volume que dans le petit.

De même, Soule (139) (1928) a démontré qu'un type S de B. subtilis, cultivé dans 5 cc. et dans 300 cc. de bouillon, atteignait à un degré de dissociation beaucoup plus haut dans la culture de 300 cc. que dans celles de 5 cc.

Substances nutritives. — Les sucres peuvent être considérés comme « le type » des excitants. Le B. coli « mutabile », lorsqu'il est cultivé sur les milieux au lactose, donne précisement une variété fermentant le lactose.

Penfold (50), en cultivant un bacille typhique sur gélose à l'isodulcite, remarqua l'apparition de colonies filles avec des activités fermentatives pour cet hydrate de carbone.

Twort (143) (1907) obtint un b. typhique capable de fermenter le lactose avec production d'acide, mais non de gaz.

Müller aussi (144) (1909) reconnaît l'action exercée par la présence de sucres dans les milieux de culture sur la variation du germe cultivé.

Eisenberg a démontré comment le charbon peut devenir asporogène sur gélose à la glycérine.

Dans notre laboratoire, nous avons noté une apparition plus facile des colonies de B. coli, de B. pyocyaneus, de bacille du charbon, ayant subi une variation lorsque ces germes sont cultivés dans de grands tubes contenant 20 cc. de bouillon glycériné.

Lombardo Pellegrino (145) (1904), en cultivant le Bac. du charbon en milieux contenant du beurre, de la glycérine, et du saindoux, remarqua que le germe subit une atténuation graduelle, que les colonies perdent leur forme« en tête de méduse » et qu'elles ressemblent à des gouttelettes de graisse, blanches comme de la porcelaine, aux marges nettes et à centre terne.

A des résultats analogues était parvenu aussi Manfredi (146) (1887) en cultivant le germe sur des milieux, où l'on avait ajouté de la graisse.

De Kruif (147) (1922) rapporte que les hautes concentrations de peptone facilitent la dissociation du B. lepisepticum.

Wilson (148) (1906) par l'addition d'urée, aux milieux de culture, obtint des formes filamenteuses du type leptotrix, du B. typhique, du coli, du pyocyaneus, du pneumo-bacille de Friedländer, et du B. enteritidis, que nous connaissons comme des formes fréquentes de dissociation au début.

Jacobsen (149) (1910) avait obtenu des colonies exceptionnellement menues de cultures de bacille typhique dans la bile.

Calmette et Guérin (1912) par des passages d'une souche virulente de Bac. tuberculeux du type bovin, sur pommes de terre mélangées avec de la bile, obtinrent la souche attenuée universellement connue comme vaccin antituberculeux B. C. G.

Pancalos (150) (1927) a constaté que la culture de bac. typhique en milieu à la bile est moins virulente que la culture en bouillon.

Etinger-Tulezynska (151) (1929) en cultivant le bacille typhique en milieux liquides avec des fragments d'organes, a obtenu, la dissociation des cultures en types S et R. Mallman et Gallo (123) ont obtenu une dissociation soudaine de souches de Brucella, en employant de la gélose au foie. Bohdanowicz et Lawrynowicz (152) (1932) ont obtenu des dissociations morphologiques, biochimiques et sérologiques très prononcées du bacille d'Eberth, en le faisant séjourner dans de l'extrait de terre, dans du sable, dans de l'eau, dans de la bile et dans de l'urine.

Le lait aussi peut être considéré comme un excitant des phénomènes de dissociation.

Gorini (55) (1902-1921) avait trouvé qu'il provoque la dissociation

physiologique, et récemment (1932) cet auteur a ajouté que l'emploi du lait peut être considéré comme avantageux même pour la dissociation morphologique.

Ce milieu nutritif a été employé pour provoquer la réversion et la stabilisation de formes « mutantes ».

Zlatogoroff (100) (1930) rapporte avoir employé le lait pour stabiliser des souches dissociées de B. typhique. Mazzetti (142) (1932) a remarqué qu'en faisant passer dans du lait des cultures de types S de charbon, on obtint la réversion vers le type R, avec formation de types intermédiaires R S. Dans notre laboratoire, Mazzetti et Vanni, en cultivant des souches R et R-S de B. anthracis ont remarqué l'apparition transitoire des colonies dites « fantôme » (P.).

Almquist (83) remarqua que les filtrats d'eau sale, provoquent chez le bacille typhique, l'apparition de formes du type leptothrix, que nous avons dit, être considérées comme le témoin de la réaction dissociative, chez beaucoup d'espèces bactériennes.

Des formes de mutation des bactéries intestinales ont été isolées même des eaux d'égoût; étant donné que dans celles-ci pullule l'agent bactériophagique, nous trouvons ces résultats en accord avec le point de vue de d'Hérelle, pour qui la dissociation serait la conséquence de l'action sélective du principe lytique.

Régime de carence alimentaire (*Starvation*). — Les milieux pauvres en substances nutritives auraient une action stimulant la dissociation vers le type R. Celle-ci paraitrait assez tôt, mais elle aurait une tendance à rétrocéder vers le type normal, plus rapidement que les types R obtenus par action du phénol, ou de l'immun-sérum.

Déjà dans les publications anciennes, nous trouvons la carence alimentaire comme raison de modifications profondes chez les bactéries. C'est ainsi, par exemple, que Casagrande (24) (1901) réussit à cultiver des bacilles pseudo-typhiques sur des petits disques de caolin imbibés de simples solutions salines; il en obtint un développement de formes typiquement filamenteuses, qui se fragmentaient ensuite en éléments en forme de cocci.

Dans la littérature récente, nous trouvons que Braun et Schaeffer (112) en employant une gélose pauvre en principes nutritifs, obtinrent le type O, d'une culture X 19. Feiler (1920), par la méthode de Braun, obtint un type R d'un bacille typhique. Seppilli et Denes (67) (1932) ont idssocié le B. coli, le B. typhique, et le Staphylocoque, en employant de la gélose sèche à 3%, pauvre de peptone, avec un pH = 8,3.

Réaction du milieu. — La concentration en ions hydrogènes des milieux de culture, a certainement une grosse influence sur les processus

biologiques des microrganismes, et, aussi, sur les phénomènes dissociatifs. Un pH approprié peut accélerer l'apparition de « mutations » de la même façon qu'un antiseptique particulier, qu'un immunsérum et qu'un hydrate de carbone.

Casagrandi (153) (1900), en cultivant le bacille du charbon sur gélose albuminée alcaline, remarqua que le germe se développait avec difficulté, en formant un enduit humide, luisant et blanc.

Kodama (152) (1912), pour le même germe, remarqua que les capsules se forment sur gélose fortement alcaline, et qu'on obtient alors le développement de colonies très semblables au type mucoïde. De Kruif (147) a démontré que la tendance à la dissociation du B. lepisepticum était retardée en milieu acide (pH = 6) et accélérée en milieu alcalin (pH = 8,5).

Reimann (155) (1925-1926) et Amoss (156) (1925) rapportent que la dissociation des pneumocoques est facilitée par un pH = 7,8 et retardée par un pH acide. Pour Zlatogoroff (100) (1930) le pH = 7,8 contribue à la production des formes R et le pH = 8 à celle des formes S du B d'Eberth. Hadley (1 +) (1927) a trouvé qu'un pH = 7,8 facilite la dissociation de beaucoup de types du groupe coli-typho-dysentérique.

Nungester (157) (1929) a remarqué que un pH très alcalin facilite l'apparition de colonies à consistance mucoïde, dans les cultures du B. du charbon.

Mais, de recherches en cours dans notre laboratoire, il résulte cependant, qu'on réussit à saisir le phénomène dissociatif, même en employant uniquement du bouillon et de la gélose au ph = 7,2.

Excitants biologiques.

Passage sur animal. — Le passage par animal est connu depuis longtemps comme un des meilleurs moyens pour modifier la virulence de certaines bactéries pathogènes et nous savons aussi maintenent qu'il peut être une cause de variation.

Gotschlich (2*) rapporte que le fait de passer par des organismes vivants, représente pour les microbes un des facteurs les plus importants pour la détermination des variations. Non seulement l'organisme hôte, réagit vis à vis de l'agent infectieux en se transformant et en produisant des substances de défense, mais l'agent infectieux aussi, par l'action de ces substances de défense de l'organisme, subit une transformation que Bail a défini « tierischer Zustand » et Sauerbeck comme « strukturelle Ampassung » des microbes.

Les modifications bien connues déterminées, sur le virus de la rage, par le passage par lapin ou par le singe, ou bien, sur le virus du rouget, par passage chez le lapin ou le pigeon sont des cas typiques de variation de la virulence.

Sanfelice (33) (1920-1921) est parvenu à démontrer que les bacilles acido-résistants saprophytes, en passant travers l'organisme animal deviennent des parasites et se transforment en bacilles qu'on ne peut pas différencier de ceux de la tuberculose, et qu'une semblable mutation est, en outre, réversible.

Kolle, Schlossberger et Pfaunestill (158) (1921) parvinrent à des résultats semblables à ceux de Sanfelice. Eisemberg (1912) provoqua la réversion d'une souche asporogène de charbon en souche sporogène, par des inoculations en série chez des cobayes. Gerbasi (38) (1925) croit avoir démontré que le B. d'Eberth peut se transformer en B. coli et en paratyphique, par cultures in vivo.

Sanarelli (11) (1927) par le passage travers l'organisme animal des bacilles fusiformes (Heliconema Vincenti) a pu remarquer le recouvrement de leur aptitude perdue a se développer sous formes spiralées.

Sans trop nous étendre, nous rappelerons encore Baerthlein (63) (1918) qui d'une culture mixte R-S de pneumobacille, n'obtint « in vivo » que la forme S. De Kruif, qui obtint l'augmentation de la forme S du B. lepisepticum; Cowan, celle du streptocoque et Griffith, Reimann et Amoss celle du pneumocoque. Hoffstadt et Youmans (122) ont obtenu des formes R et G (filtrantes) du staphylococcus aureus, chez le lapin, et Morton C. et Kahn (159) (1932) les formes S du B. aviaire, en ensemençant la pulpe de la moelle osseuse d'un lapin mort d'une infection endoveineuse de la forme R. Quant aux autres germes, on doit remarquer que lorsque l'on inocule à un animal la forme R pure, celle-ci reste invariable Baertha remarqué que le passage par cobaye de forme R, R-S et S de charbon ne provoque aucune réversion, et il a pu isoler de nouveau les formes mutées tant du sang circulant que des divers organes, y comprise la moelle osseuse.

Les études sur l'influence du passage de cultures virulentes par des animaux immunisés, nous font connaître que l'effet le plus commun consiste dans la production d'une culture entièrement ou presque avirulente.

Le vibrion de Metchnikoff, par exemple, inoculé à des animaux vaccinés, perd sa virulence (Sanarelli) (15) (1893). Sacquèpèc (160) (1901) en plaçant le B. typhique en sacs de collodion et dans le péritoine de rats immunisés, obtint une culture non agglutinante, simulant les bacilles dits « Eberthiformes ».

Cowan (161) (1924) isola des types R et S de Streptocoques deslésions articulaires de lapins, qu'il avait traités avec des types S purs.

Sérum et sang normal. — Il est connu depuis longtemps que les bactéries développées dans du sérum ou du sang normal sont susceptibles de changements morphologiques plus ou moins marqués; mais, on ne peut pas dire qu'elles soient d'une nature dissociative. Behring et Nis-

sen (162) (1900) ont démontré, parmi les premiers, que, sous l'action des sérums normaux, les propriétés biochimiques et sérologiques des germes peuvent subir des altérations. Hess (163) (1921) au moyen du passage continuel en bouillon additionné de sérum normal de cheval, parvenait à faire perdre la capsule à deux souches de charbon.

Comme exemple plus significatif, mentionnons Eagles (161) (1928), qui réussit à obtenir des colonies R et S de streptocoques hémolytiques cultivés pendant beaucoup de générations en bouillon et sur gélose additionnée de 10% de sérum de cheval; Nungester (157) qui remarqua une augmentation du type R dans une souche dissociée de charbon, cultivée en bouillon-sérum à 10% et laissée vieillir; Reed (132), qui dans des liquides culturaux avec du sérum normal, remarqua la dissociation R S du B. C. G.; Paulson et Brown (165) (1932) qui en cultivant sur gélose au sang des bacilles du groupe coli, obtinrent des colonies semblables à celles $\alpha, \alpha', \beta, \gamma, \delta$, des streptocoques; Enders (166) (1932) qui a obtenu une variante R de meningocoques au moyen de passages répétés (20 environ) en sang de lapin, frais et défibriné.

Sérum et sang immuns. — Metchnikoff (167) (1887) remarqua que la virulence du B. anthracis s'amoindrissait lorsque ce microrganisme était tenu en contact avec de l'immun-sérum. Roger et Charrin ont démontré la même chose, pour le streptococcus, le pneumocoque et le B. pyocyaneus.

Sanarelli (15) (1893) en mettant en contact le vibrion de Metchnikoff avec un immun-sérum homologue, ne remarqua aucune atténuation, mais parfois, une augmentation de virulence. Ramson et Kitishima (168) (1898) en cultivant le vibrion du choléra en bouillon contenant du sérum anticholérique (1 : 100) remarquèrent que son pouvoir agglutinant diminuait. Hamburger (169) (1903) en cultivant le même germe sur un milieu, additionné d'immun-sérum (1 : 150-1 : 40) remarqua après diverses générations une agglutination spontanée du germe. Nicolle (170) (1898) démontra que l'immun-sérum antityphique donnait aux cultures de ce germe l'autoagglutinabilité (caractère de la forme R). Pareillement, Steinhardt (171) (1904) observa le même phénomène tant pour le B. typhique que pour les B. dysentériques, tandis que d'autres auteurs, avec un même traitement, obtinrent la perte du pouvoir agglutinant [Morishima (101), Zinsser (172) (1920), Feiler (127), Andriani (173)].

Dans la littérature plus récente nous trouvons des études très intéressantes qui ont pour but la recherche des processus dissociatifs provoqués en cultivant les germes en présence d'immun-sérums. Nous ne ferons que rappeler les quelques exemples les plus démonstratifs.

Les premiers et les plus intéressants sont ceux de Griffith (174) (1923)

sur le pneumocoque. Des cultures virulentes (type S) des trois types de pneumocoque (I, II et III) lorsqu'elles se développent en immun-sérum homologue (concentré ou dilué) montrent une dissociation S—→ R, progressive et la dissociation R est déjà complète au troisième passage.

La culture virulente S n'est en rien modifiée, en se développant, sur un sérum anti-R, tandis que mise en contact avec un sérum anti-S, elle se dissocie en colonies R et S.

Soule (139) établit que, pour ces essais, le sérum ajouté à 10% au milieu suffit, et qu'il possède la même action dissociative que les concentrations plus hautes. Lorsque des formes R et S de B. subtilis étaient cultivées dans un immun-sérum S, il ne survenait aucun changement vers R; tandis que les formes *S* se dissociaient en formes R dans la proportion de 80%. D'ailleurs, lorsque les cultures R et S étaient placées dans un immunsérum R, les formes S ne subissaient aucun changement, tandis que les formes R retournaient à S dans la proportion de 40%.

Reed (134) a obtenu des colonies S de 4 souches de B. C.G. soumises à l'action d'un sérum de lapin anti-R.

Mallmann et Gallo (123), sur trois espèce de Brucella obtinrent des phénomènes dissociatifs par culture en bouillon à 10% d'immun-sérum.

IV. — Differentes formes de dissociation bacterienne.

Depuis longtemps on a pris en considération la relati on entre la forme des colonies et les propriétés biologiques du germe. Les recherches faites à ce propos sur le charbon et sur les autres germes, par Preisz (91) (1904-1908-1911), par Eisemberg (49) (1912-1914), par Baerthlein (1912 (175) 1918 (53)), par Bail et Flaumenhaft (176) (1917) représentent les premières de cet édifice, auquel les recherches de Weil et Felix (1917) sur le Proteus, de Neisser et Massini (1906-1907) sur le B. coli « mutable », de De Kruif (1921-1922) sur le B. lepisepticum ont donné une base définitive.

Sans vouloir aller au fond de la question, pour le moment, pour chaque travail, il est intéressant remarquer que ces auteurs ont pu s'assurer qu'à la différence de la morphologie des colonies, correspond une variation des propriétés biologiques et sérologiques du germes.

Des directives générales bien précise, dont le châpitre des dissociation tire des avantages quotidiens, ont été données par Arkwricht (54) (1921). Cet auteur, nous l'avons vu, en travaillant sur le groupe typho-coli-dysenterique, est parvenu à distinguer deux types fondamentau de colonies: un type de colonies lisses ou type S (Smooth) et un type de colonies rugueuses type ou R (rough).

La colonie S ou lisse est ronde, luisante, transparente et à surface lisse.

La colonie R présente des bords dentelés et irréguliers; elle est plus terne et sa surface est ruguense.

Cette différentiation chez les deux types fondamentaux de colonie, présente un intêret même pratique, parce qu'elle correspond à une profonde dissociation dans les caractères culturaux, biologiques et sérologiques du germe.

Arkwright put démontrer l'existence de ces deux types de colonies dans les cultures du B. typhique, du B. paratyphique B, du B. dysentérique Shiga, du B. de la pseudotuberculose des rongeurs, etc.

D'après les données de ce travail d'Arkwricht, les types de colonies R, S et d'autres semblables ont été reconnus de même pour le choléra (Valteanu (177) 1924), pour le groupe des salmonella (Bruce, White (110) 1925-1926), pour le groupe des brucella (Hadley (1*), Zdrowsky, Breen et Voskressensky (178) 1930), pour le pneumocoque (Griffith (174) 1923-28), pour le streptocoque (Cowan (161) 1922-23-24; Todd (179) 1927), pour le Bac. F. Friedländer (Julianelle (180) 1926), pour le Bac. du charbon (Nungester (157) 1929), pour les B. subtilis, mycoïdes, megatérium, mésentéricus, cereus (Soule (139) 1928, (99« 1932), pour le Bac. pyocyaneus (Hadley), pour le méningocoque et le gonocoque (Atkin (181) 1923-1925), pour le Bac. diphtérique (Crowell (182) 1926) pour le Bac. de Pfeiffer (Kun et Fenyvessy (183), 1932), pour le Bac. de la tuberculose et le B. C. G. (Petrofl, Branch et Steenken (184) 1927).

En étudiant le travail d'Arkwright, il apparait manifeste que les types de colonies décrits précédemment par divers auteurs et désignés par des termes différents (α et β de Bail et Flaumenhaft (176); $\alpha, \beta..\gamma$ de Henri (104), 1914), A et B de Wagner (185) 1920), pour le Bac. du charbon; D et C de De Kruif (147) pour le Bac. lepisepticum; I, II, III de Firtrch (16) 1888, pour le vibrion Frinkel-Prior; M. S. et M. G. de Bordet et Sleewyk (186) 1910, pour le B. pertussis etc) peuvent se rapporter aux types R. et S. de Arkwricht, sinon exactement, du moins d'une manière très approchée.

Il n'est pas encore bien défini, par contre, si les deux types de colonies H (Hauch = halo) et O (hone Hauch = sans halo) décrits par Weil et Felix pour le Proteus, correspondent exactement aux deux types d'Arkwricht.

Dans l'ensemble, on peut donc voir que pour tout ce qui concerne les relations entre la morphologie des colonies et la variation des propriétés biologiques et sérologiques, le problème a été abordé par l'Ecole anglaise avec Arkwright, pour la dissociation des colonies, en prenant comme point de départ la recherche des divers caractères morphologiques; par l'Ecole Américaine, avec De Kruif, en prenant en considération particulière les variations de virulence des colonies, et par l'Ecole Allemande,

avec Weil et Felix, en recherchant comment se comportaient des caractères serologiques, par rapport aux divers degrès de dissociation, caracterisés par la morphologie des colonies.

A la lumière de ces études, s'ètablit un tableau très complexe de points de vue ; dans ce cadre on peut faire rentrer les résultats des travaux précédents.

On ne peut pas aujourd'hui résoudre le problème par la seule recherche morphologique, ni par celle du dégré de virulence, ni des propriétés antigèniques, parce que ces aspects sont dans une dépendance réciproque très étroite lesuns des autres et parfois même inséparables. L'Ecole allemande, cependant, continue à se baser essentiellement sur la constitution antigènique des formes évoluérs.

Formes « R. S » et leurs propriétés. — Celui qui entreprend l'étude de la dissociation microbienne se demande inévitablement si les deux formes décrites par Arkwright, représentent réellement les deux types principaux de variations, et si celles-ci ont la même signification pour tous les germes. Mais, pour aussi soigneusement qu'il cherche dans la littérature, il ne peut pas répondre avec certitude.

Nous avons dit, en effet, que ce problème sera examiné ultérieurement et que les deux types H et O de Weil et Felix ne peuvent pas être complètement assimilés aux types R et S. D'autres variations, encore: colonie muqueuse, colonie fantôme, colonie suicide, microcolonie, etc., ont été décrites dans tel ou tel autre germe. Il en est de même de cette forme. I trouvée par Begnie (187) (1931) dans les cultures du B. C. G.; on ne sait pas avec certitude si on doit les considérer comme des formes à part, ou comme des types intermédiaires entre R et S.

Il résulte, cependant, que les deux variantes R et S n'ont pas la même signification pour chaque germe. Si beaucoup de micorbes se développent normalement en produisant des cultures du type lisse (groupe-typho-coli-dysentériques, choléra, brucella, staphylocoques, pneumocoques, pyocyaniques diphtériques, etc.), d'autres produisent des cultures du type rude (charbon, subtilis). Si pour les premiers le type S doit être considéré comme normal, c'est à dire, comme typique du germe, et le type R comme variante, pour les deuxièmes c'est le contraire.

Cette distinction aussi, cependant, ne doit pas être prise en sens absolu, parce que, pour le bac. du charbon, par exemple, on n'a pas encore fait jusqu'ici d'analyse des qualités antigènes des formes variantes (S). Cette condition est essentielle, d'après Arkwright, pour pouvoir obtenir une indication précise du type auquel les colonies appartiennent.

Ce serait un tort d'ailleurs de s'imaginer, qu'un phénomène dissociatif puisse se vérifier dans les cultures microbiennes, seulement lorsque l'on observe une différenciation nette du type des colonies. On peu avoir

en effet une dissociation plus ou moins profonde sans variation concomitante de la morphologie des colonies.

Une des observation les plus importantes à ce propos, est dûe à Neisser (1906) et ensuite à Massini (1907) qui confirma et développa ce que le premier avait déjà observé. Le B. coli, étudié par ces auteurs possédait la propriété de produire, sur gélose-endo, exclusivement des colonies blanches; mais après 2 ou 3 jours, ces colonies montraient des colonies filles (papilles = Knöpfe) qui, à une 1.re période, étaient blanches et ensuite devenaient rouges. Ce phénomène ne se vérifiait pas sur la gélose à la mannite ou au glucose. Si les colonies filles étaient répiquées, elles ne produisaient que des colonies blanches, formant ensuite des papilles rouges. Celles-ci au contraire, produisaient des colonies blanches et rouges. Les colonies rouges, par contre, ne produisaient que des colonies rouges, et elles ne donnaient jamais lieu au développement de colonies filles. Les colonies rouges, aussì bien que les blanches, ou que les colonies filles, ne présentaient pas de variation dans la morphologie. Des données identiques ont été obtenues par Reiner Müller (29, 144) (1908-1909-1911) sur le Bac. typhique cultivé sur gélose au ramnose et sur le paratyph. B. cultivé sur gélose au raffinose. Même Twort (143) (1907) et Penfold (50) (1910-1912), par un procédé d'entraînement sur des milieux contenant du lactose, ont obtenu, une souche de B. typhique qui fermentait le lactose avec production d'acides, mais sans gaz. Cette variante était un Bac. typhique normal du point de vue morphologique et sérologique, sauf qu'il avait la propriété de former une pellicule dans les cultures en bouillon, et de fermenter la sorbite en 10 jours, au lieu de 24 h.

D'autre part, dans notre laboratoire on a pu observer que des souches de B. du charbon, dérivées de colonies R S et de colonies intermédiaires gardaient invariables tous les autrés caractères (Mazzetti) (142).

On peut donc affirmer, que les souches bactériennes sont susceptibles de perdre et d'acquérir des propriétés jugées fondamentales (fermentation, virulence, etc.) sans présenter une variation des caractères des colonies et vice-versa.

Cette affirmation, en vérité, ne nie pas l'importance des caractères morphologiques des colonies dans l'étude de la dissociation bactérienne, mais elle est là pour indiquer, que ces caractères acquièrent une plus grande importance pratique, lorsqu'ils sont en corrélation avec des changements plus ou moins profonds des propirétés biologiques.

Hadley (1) résume dans le schema suivant les propriétés des formes S et R. Ce schèma exact, quant à sa ligne générale, présente maintenant des lacunes, et il peut demander, dans quelques cas, des modifications.

Hadley y indique, en effet, la forme S comme normale, et la forme R comme une variante; or, nous savons maintenant que si c'est-exact

pour quelques espèces bactériennes, cela ne correspond pas à la réalité pour d'autres espèces (B. du charbon, B. subtilis) d'où il résulte que ce schèma n'a une valeur complète que pour quelques groupes bactériens seulement.

C'est pourquoi nous avons jugé apportun d'enlever à la lettre S son rapport avec le type normal et à la lettre R celui avec le type variant, et nous avons apporté à ce schèma quelques adjonctions, découlant des résultats de recherches récentes.

TYPE S	TYPE R
Trouble homogène en bouillon.	Croissance agglutinée en bouillon.
Suspension normale en solution saline de NaCl à 0,85% et de Cu.Soï à 1%.	Agglutination en sol. saline de NaCl à 0,85% et de Cu.SOï à 1% (exception faite pour le Bac. du charbon) (1).
Développement normal sur gélose.	Souvent tendance à l'étalement sur gélose (2).
Colonies lisses, régulières, convexes.	Colonies rugueuses irrégulières, aplaties.,
Peut donner lieu au développement de colonies secondaires ou colonies filles.	Croissance exceptionnelle de colonies secondaires ou colonies filles.
Peut donner sur gélose un enduit mou, souple et terne.	Donne sur gélose un enduit de type rugueux et friable.
Fluorescent.	Non fluorescent.
Formation de pyocyanine.	Aucune formation de pyocyanine.
Mobilité (chez les espèces mobiles) (3).	Immobilité (chez les espèces mobiles) (3).
Présence de capsule.	Absence de capsule.
Biochimiquement plus active.	Biochimiquement moins active.
Possède deux antigènes S et O.	Souvent, ne possède que l'antigène R. Peut posséder aussi celui S ou O.
Possède la « substance spécifique soluble ».	Perte de la substance spécifique soluble.
Agglutination du type flocco-granulaire dans le sérum.	Agglutination par flocons seulement dans l'immun-sérum.
Non agglutinable à la trypaflavine a 1°/°°.	Agglutinable à la trypaflavine à 1°/°°.
Si la souche est normalement pathogène, elle est virulente (toxique) (4).	Si la souche est normalement pathogène, le type est peu, ou point virulent (non toxique) (4).
Fréquent au cours de l'infection.	Plus fréquent chez les convalescents et chez les porteurs.
Plus fréquent dans les infections aigües.	Plus fréquent dans les infections chroniques.
Sensible au vieillissement.	Plus résistant au vieillissement.
Sensible à l'action du bactériophage.	Plus résistant à l'action du bactériophage.
Représenté par les formes vivant, dans les conditions optimum de développement.	Produit au cours des processus d'adaptation.
Cellules bactériennes à morphologie normale.	Tendance à se développer en courtes chaînettes, sous forme de cocci.
Varié en O (intermédiaire) ou en R par l'immun-sérum (5).	Non réversible en S par l'action de l'immun-sérum (5).
Résistant à la phagocytose.	Sensibles à la phagocytose.
Plus résistant à la chaleur humide, à la dessication et aux antiseptiques (phénol) (6).	Moins résistant à la chaleur humide, à la dessication et aux antiseptiques (phénol). (6)

(1) Les émulsions du B. charbonneux forment des sédiments; mais elles ne sont pas agglutinées, pas même en solutions d'1 et 2% de chlorure de sodium (Mazzetti).

(2) Exception apparente dans le cas du B. proteus.

(3) En désaccord avec les recherches récentes.

(4) Relation avec la toxicité établie pour le bac. de la diphtérie et le Bac. enteritidis, admise pour le bac. dysentérique Shiga et le Bac. botulinus.

(5) Etablie pour le Bac. subtilis (Soule).

(6) Démontré par *Seppilli* et *Denes* pour le Bac. typhique.

La propriété de la forme R d'être agglutinée par la trypaflavine à 1 : 1000 a été mise en évidence par Pampana (44) (1931) comme suite à un travail d'Alessandrini et Sabatucci (45) (1931) sur la différentiation des micorbes du genre Brucella.

La forme R posséderait cette sensibilité à l'action de la trypaflavine probablement sous la dépendance d'un facteur unique commun ä toutes les variantes R, même appartenant à des germes divers.

Pampana est arrivé à démontrer qu'en dehors des variantes R du groupe typho-coli, la Br. paramélitensis est aussi agglutinée, et non pas la Br. abortus e la Br. mélitensis; il considère la Br. paramélitensis comme des formes R du groupe Brucella. Ces recherches ont été confirmées par Pugnani (188) (1932), Müller (189) (1932) et Spinelli (69). Seppilli et Guiso (66) ont pu constater que la phase mycéliale du Sacc. Cerevisac, assimilable au type R est agglutinée par la trypaflavine, tandis que la phase ovale S et la forme mycéliale inverse ne sont pas ägglutinables.

Sabatucci (65) (1931) à pu déceler par l'agglutination à la trypaflavine, la variante R dans les cultures de staphylocoques.

Dans notre laboratoire, on a démontré que la forme R du Bac. du charbon, correspondant au type normal de développement de ce germe, est régulièrement agglutinée par la trypaflavine, tandis que la forme S, lorsque cette forme variante existe, n'est pas susceptible d'agglutination (Mazzetti) (142).

Mode d'apparition des variantes et des types intermédiaires. — L'apparition des types variante, ainsi que nous l'avons déjà rappelé, peut survenir ou soudainement ou graduellement. Le mode d'apparition dépend probablement de l'action plus ou moins violente ou prolongée d'un facteur stimulant la dissociation. Bien qu'on rapporte des cas où la forme dissociée soit apparue soudainement, la plupart des auteurs croient que celle-ci est précédée de l'apparition de types variants intermédiaires. Ceux-ci, par leur signification et par certaines particularités, présentent des aspects très intéressants.

Le type intérmédiaire possède des caractères, en partie, propres de la forme normale, et en partie, à la forme variée extrême; il présente un caractère remarquable d'instabilité. En effet, tandis que le type varié extrême possède une stabilité relative (même s'il est soustrait à l'action du facteur excitant), le type intermédiaire a une tendance plus ou moins forte à rétrocéder vers le type original normal, ou à progresser vers le type varié extrême. Ce déterminisme est probablement, lié aussi aux stygmates laissés par l'action du facteur excitant, qui développent leur influence, même à une certaine distance, et se transmettent par voie héréditaire.

Il est connu que lorsque la forme variée a fait son apparition dans une culture microbienne il est nécessaire d'utiliser de procédés de purification, c'est à dire de sélection, pour pouvoir mieux fixer les caractéres acquis.

Bien des fois, une colonie avec des caractères peu définis entre S et R (et qu'on pourrait considérer pour cela comme un type intermédiaire S R ou R S, selon qu'elle se rapproch plus du type S ou du type R) progresse vers le type varié extrême au cours des séries d'isolements sélectifs au lieu de rétrocéder vers le type normal. On peut obtenir un même résultat en dehors de toute autre intervention artificielle, et il peut s'accompagner d'une perte progressive ce certaines propriétés fondamentales, par exemple le degré de la virulence.

Le fait a été clairement démontré par des recherches exécutées à notre laboratoire sur la dissociation du Bac. du charbon. Une souche asporogène de Bac. du charbon obtenue en cultivant une souche sporogène et virulente en bouillon additionné de 0,5 : 1000 de bichromate de K. a perdu peu à peu son degré de virulence.

Cette souche a présenté en même temps une transformation progressive du type des colonies de R→S en passant par un type intermédiaire R S. Cette souche trouvée, et dissociée sur les milieux solides ordinairer, a présenté trois types de colonies R, R S et S le premier et le troisième relativement stables, le deuxième en évolution continuelle vers le type S, avec perte progressive de son dégré de virulence. D'un autre côté, les souches normales (virulentes) de Bac. du charbon, dissociées dans les types R, R S, S R, et S par de fréquents passages en bouillon, ont montré: 1) la forme R stable; 2) la forme S en voie de régression en passant par les types intermédiaires vers le premier type; 3) des types Intermédiaires avec une tendance au retour précoce et rapide vers le type normal.

Ce facteur excitant les processus de dissociation, très actif sur les souches normales de charbon, a, au contraire, comme nous avons vu, un effet très faible sur les autres germes. Sur neuf souches de Bac. coli répiquées quotidiennement, en bouillon normal (pH = 7,2) nous avons aussi obtenu les forme R et S pour une seule souche; par contre, sur 6 cultures en bouillon, des mêmes souches de Bac. coli vieillies à la température ordinaire pendant 20 jours, on obtint trois formes dissociées R et S et une forme intermédiaire à caractère rugueux (R S).

Tout ceci a pour but de rappeler comment le phénomène de la dissociation présente des caractères divers selon la nature du facteur excitant; et de quelle manière l'action de ce facteur, peut, si elle est violente, faire sentir son influehce même à distance, ou provoquer, si elle est légère superficielle, un retour rapide des formes variées au type normal.

Nous avons aussi dit qu'il est probable, que l'extension et l'impor-

tance du phénomène dissociatif varie dans une même espèce microbienne, selon les sensibilités individuelles; il s'agit d'une veritable et idiosyncrasie propre à chacune des souches vis à vis de l'agent excitant la dissociation.

On explique donc ainsi, comment, sur 4 souches normales et virulentes de charbon, soumises dans notre laboratoire au même traitement dissociatif, deux aient présenté seulement un faible pourcentage de colonies variées, tandis que chez les deux autres ces formes avaient numériquement dépassé celles du type normal.

Présence des formes R et S dans une culture dissociée. — Dans une culture en milieu liquide, la présence de formes R et S peut être évaluée par le pourcentage des formes variées, par rapport à celles restées normales et aussi par le fait que la forme variée présente une déviation par rapport au type à développement normal du germe. Il s'en suit que pour l'exacte évaluation du phénomène dissociatif les formes R et S doivent toujours –tre étudiées sur des milieux solides, par des isolements en séries sur des plaques de gélose en choissisant les colonies les plus typiques de chacune des formes dissociées.

De cette façon, on peut avoir aussi une idée de la stabilité de la souche provenante de chaque type, et on devrait obtenir, au moins théoriquement, la souche R S à l'état de pureté. Par exemple, si dans une colonie R, des éléments S sont encore présents en nombre variable, au cours d'un isolement sélectif ultérieur, ceux-ci regènérent parmi les colonies R un nombre proportionné de colonies du type S, qui peuvent ainsi etre éliminées. Mais pratiquement, cette opèration n'est pas si facille qu'on le croirait à première vue, et très souvert on obtient des résultats contraires à ceux escomptés.

D'après les plus récentes recommandations d'Arkwricht lui même (3) (1930) on ne doit pas parler de variantes R et S en se basant uniquement sur l'aspect morphologique. Les formes variantes ne doivent être vraiment considérées comme telles, que lorsqu'elles sont accompagnées par des variations de la virulence, de la constitution antigènique et des propriétés agglutinatives, soit vis-à-vis des sérums, soit vis à vis des solutions de NaCl. D'ailleurs, et nous avons déjà abordé ce sujet, on peut se trouver en présence de phénomènes dissociatifs, qui ne peuvent pas être révélés par l'examen des caractères morphologiques des colonies. Qu'on prenne par exemple, les études d'Andrewes (190) (1922-1925) sur la structure antigènique du groupe des salmonella (phase spécifique et aspécifique) et celles de Sabatucci (65) (1931) sur la manière de se comporter des colonies de staphylocoque vis a vis de la trypaflavine. A vrai dire, l'objection d'Arkwright ne semble pas totalment injustifiée; elle ne le serait que si l'on

pouvait démontrer par un ensemble complet d'épreuves, qu'il y a des germes capables de se dissocier en colonirs R et S sans qu'absolument aucun autre caractère, en dehors de ceux de morphologie des colonies, subisse de variation. Il est difficile qu'un excitant à la dissociation, même s'il est doux, limite à ce point sa propre action. Si l'on se met dans les conditions rigoureuses requises pour exclure les influences momentanées et étrangères on doit admettre implicitement qu'à toute variation du type de la colonie correspondent des variations dans les caractères des bactéries qui la constituent. Dans notre laboratoire, Mazzetti a démontré que le Bac. du charbon peut se dissocier en deux types de colonies R (normal) et S (varié). Or, bien que la forme S garde invariables tous les caractères les plus importants vis-á-vis de la forme R (capsules, spores, pouvoir de liquéfier la gelatine, virulence, etc). l'aspect des cellules bactériennes, la manière de se développer en bouillon, façon de se comporter vis à vis de la trypaflavine, justifient néanmoins l'affirmation, que le phénomène dissociatif s'est produit. Mais, de ces exemples et d'autres recherches (Nungester (157) 1929) il résulte, plutôt, que le phénomène dissociatif peut réaliser pour un même germe, une extension plus ou moins accusée et une action plus ou moins profonde, suivant l'energie du facteur stimulant. Il est certain que pour arriver à une conclusion, il faut attendre qu'un examen systématique d'après les directives des travaux de Soule (139) (1927) pour le B. subitlis; de Griffith (178) (1928) pour les pneumocoques et de Schoeckaert (191) (1919) pour le Bac. du charbon, puisse être fait pour d'autres espèces bactériennes a bien définies.

Apparition des colonies secondaires ou filles (*Papilles*) *et leur signification.* — Que l'apparition des « colonies filles » soit en étroite corrélation avec le phénomène de la dissociation, le fait résulte bien des travaux de Neisser et Massini sur le B. coli « mutabile ». Nous avons vu aussi que Stewart met en rapport le phénomène ainsi que la formation de la spore, avec un stade particulier du développement du germe qu'il a lui même dénommé « phase critique », c'est à dire, stade pendant lequel le germe est particulièrement sensible et apte à présenter des phénomènes dissociatifs.

L'apparition des colonies filles à été décrite chez de nombreuses espèces bactériennes, et on doit signaler à cet égard les travaux de Preisz (19) (1904) pour le Bac. du charbon, d'Eisemberg (49) (1906) pour divers germes, d'Enderlein (192) (1916), pour le Bac. prodigiosus, de Reiner Müller) 144, 26) (1908-1909-1991), pour le Bac. typhique, de F. Hodley (cité par P. Hadley) (1*) pour le Strep. Faecalis.

L'apparition des colonies filles ne survient pas dans des limites bien connues; elle est un phénomène secondaire et se produit probablement sous l'influence de la température (il paraît que le développement à tem-

pérature ordinaire facilite cette apparition) et de la réaction du milieu. L'apparition des colonies filles témoigne, presque toujours, d'un phénomène dissociatif, puisqu'il arrive rarement que, celles-ci reproduisent les caractères de la colonie mère. Elle correspond à ces phénomènes de variation que l'on observe dans les cultures des mycètes et qui sont indiquér sous le nom de « secteurs variants ou de variation ».

Dans notre laboratoire, au cours de recherches particulièrement basées sur des isolements sélectifs er milieux normaux (bouillon et gélose à pH 7,2) en dehors des colonies filles ayant des caractères de variantes, nous avons pu observer une colonie du V. du choléra de type R et une du B. pyocyanique de type R muqueux, qui présentaient des rayonnements marginaus reproduisant le type des colonies normales d'origine. Dans de tels cas, les filiations manifesteraient un fait régressif.

Phénomènes érosifs et leur rapport avec la dissociation. — Le phénomène de l'apparition de zones d'érosion chez les colonies ou dans les enduits culturaux ne doit pas être confondu avec celui très semblable, produit par la présence du bactériophage. Preisz (91) (1904), Pico (193) (1922), Monteino (194) (1923), Pesch (195) (1925), Katzu (93) (1925, v. Barany (196) (1927) et d'autres encore, ont décrit le phénomène pour le Bac. du charbon (pseudobattériophagie), Sonnenschein (197) (1925) l'a décrit pour une monilia. L'apparition de semblables érosions est en rapport avec des phénomènes dissociatifs. Des cultures provenant de colonies et d'enduits présentant ces érosions ont donné lieu à des colonies variées qui se rapportent aux types R ou S (Hadley (1*) 1925). Très voisine de tout cela, est la formation de formes particulières de régénération à frange et à halo: Neisser (46) et Massini (47) 1906-1907; Bernahardt (27) 1925; Baerthlein (53) 1918; Braun et Schaeffer (112) 1919.

Caractéristiques biologiques des souches dissociées. — La relation entre les types des colonies dissociées et la variation des caractères morphologiques, culturaux, biochimiques et biologiques des cultures dérivées de ceux-ci a été mise en évidence par divers auteurs. Au contraire, comme nous l'avons vu avec Arkwright, on ne devrait pas parler de formes R ou S quand on n'a pas vérifié chez elles des variations stables des différents caractères biologiques et antigéniques. Mais (et l'on a déjà abordè ce sujet), pour juger les variations bactériennes, on devrait considérer aussi les changements des caractéristiques élémentaires des germes (manière de se développer dans les milieux liquides, morphologie de la cellule bactérienne, manière de se comporter à l'égard de la coloration de Gram, sporulation, capsules, cils, propriétés protéolytiques et fermentatives etc). Quelques uns de ces caractères, les cils, par exemple (Neri, 61) même s'ils sont perdus, ne semblent pas avoir une valeur vraiment

considérable, tandis que la perte de la spore (B. du charbon) de la capsule (pneumocoque) semble être liée à la dégradation de la virulence. Ce n'est pas le cas d'exposer ici en détail, les recherches et les résultats de nombreux auteurs qui ont travaillé cette question, et il serait trop long d'exposer les variations décrites pour chaque caractère morphologique cultural ou biologique, de chaque germe en particulier.

A l'égard de différents caractères, que nous avons déjà mentionnés avant, je dirai en résumé, que le type varié, tant R. que S. peut montrer une dégradation plus ou moins profonde des caractères élémentaires, s'éloignant parfois un peu, et parfois d'un manière décisive du type normal. Il en résulte des types qui offrent une réelle difficulté d'identification pour le bactériologue, surtout quand le facteur stimulant ne se manifeste pas clairement ou bien s'il a échappé à l'observation.

Dans un travail récent, Sepilli et Denes (67) ont démontré que les formes R (variées) du Bac. coli, du Bac. typhique, du Micr. pyogenes (var. alba) et la forme mycéliale du Sacc. cerevisiae (correspondant à la forme R des bactéries) présentent une affinité Gram positif plus grande que la forme S et la forme èlliptique du Sacc. cerevisiae (correspondant à la forme S des bactéries). Ces auteurs ont employé une méthode de Gram modifiée et ils ont mis en parallèle le dégré différent de résistance de la phase R et S avec la constitution chimique différente des phases elles mêmes. Cet argument à besoin d'éclaircissements ultérieurs, car, beaucoup d'auteurs ont trouvé, par contre, que la phase variée présente plus ou moins constamment, une dégradation dans la résistance au Gram. Les recherches de Nungester (157) sur le Bac. du charbon parlent en ce sens. Puisque la forme normale de ce dernier germe est la forme R, il reste à démontrer si la plus grande résistance à la décoloration par l'alcool, est un apanage constant de la forme R, aussi bien normale que variée.

Dissociation et virulence. — Celui qui entreprend une revue des travaux traitant de la virulence des souches variées se trouve, dès le début devant à un carrefour.

La recherche qui a pour but de transformer les souches virulentes en souches atténuées date des premiers temps de l'ère bactétiologique (Pasteur et ses collaborateurs). Il s'en est suivi un nombre énorme de travaux plus ou moins importants, dans lesquels les différents auteurs, tout en décrivant en détail l'atténuation de la virulence de leurs souche, n'y virent aucun rapport particulier avec une variation du type des colonies. Ces contributions doivent-elles être comprises dans le chapitre de la dissociation ?

Pour répondre à cette question, une critique soigneuse de chaque

travail serait nécessaire. Mais en se limitant aux auteurs qui s'appuient mieux sur des documents, on a la sensation qu'en beaucoup de cas ils aient réellement obtenu et décrit de véritables phénomènes dissociatifs. Je crois, qu'à ce propos, on doive surtout rappeler les travaux de Preisz (91) (1904-1908-1911) sur les vaccins pasteuriens. Il réussit à isoler trois sortes de colonies, qu'on peut rapporter aujourd'hui aux types R S. R et S. Le premier type avait, en effet, l'aspect de la colonie normale du Bac. du charbon, et était virulent pour le rat (R); le deuxième était visqueux, possédait des élements bactériens peu capsulés et il était virulent pour le rat (R S), mais dans l'organisme de cet animal, il se transformait er type R; le troixième type était acapsulé et avirulent (S).

De l'ensemble des résultats obtenus par divers auteurs il est juste d'affirmer que la déviation du type normal des colonies vers une variante R S ou intermédiaire, selon les cas, a presque toujours été obtenue parallélement à une dégradation des propriétés pathogènes. Cette affirmation même ne doit être acceptée que comme une règle générale, car, il existe des exceptions à cet égard. Dans notre laboratoire, nous avons eu l'occasion d'observer dans des souches de Bac. du charbon, peu ou pas du tout virulentes, des colonies parfaitement normales. Mais les souches étaient variées par rapport au type développé en bouillon.

Les divers auteurs qui se sont surtout occupés du problème de la dissociation, donnent, et avec raison, beaucoup d'importance au travail de De Kurif (147) (1921) sur un représentant du groupe des pasteurella: le B. lepisepticum. De Kruif put obtenir de celui-ci deux souches, l'une virulente (D) et l'autre avirulente (G) qui correspondent aux types S et R de Arkwright. Le travail de cet auteur est important parce qu'il tend à démontrer que la virulence dépend du nombre des germes S (normaux) dans la culture. La raréfaction des germes du type S et l'augmentation correspondante de ceux du type R (variés) amène une diminution de la virulence.

Arkwright (54, 198) (1921-24-26-27-29) a étudié le premier, et exactement, le dégré de virulence des formes R et S dans le groupe des B. dysentériques, démontrant que la forme variée est plus ou moins avirulente.

Des études analogues avec de semblables résultats ont été faites par Topley et Ayrton (199) (1924) pour le bac. de Aertryck; par Bruce White (110) (1925) et par Orcut (200) (1923) pour quelques germes du groupe des Salmonella; par Julianelle (150) (1926) pour le Bac. de Friedländer: par Cowan (161) (1922-23-24) pour le Streptocoque; par Crowell (182) (1926) pour le Bacille de la diphtérie; par Gratia (201) (1921) et Goyle (111) (1926) pour le Bac. coli; par Nungester (157) (1929) et par Mazzetti (142) (1932) à propos du Bac. du charbon; par Kuhn et Fenyvessy (183) (1932) pour le Bac. de Pfeiffer; par Hoffstadt et Joumans (122) (1931) pour le Staphylocoque.

On doit accorder une mention particulière aux travaux de Griffith (174) (1928) sur les pneumocoques.

Cette étude présente une importance spéciale à cause de ses indications utiles sur la stabilité des types de pneumocoques. Griffith, en cultivant le pneuomcoque en présence de sérum spécifique, a pu obteinr la dissociation en formes S et R (variante). La forme R perdait sa virulence plus ou moins avec la substance typo-spécifique soluble, et avec la capsule, mais elle était réversible vers la forme S au moyen d'un passage par animal, recouvrant ainsi la virulence. Les travaux de Griffith ont été confirmés par Reimann (155) (1925); par Amoss (156) (1925, Neufeld et Lewinthal (202) (1928), par Dawson, Martin, Avery, Osvald (203) (1927), par Dawson et Martin (204) (1928) et par d'autres auteurs qui remarquèrent la réversion des formes R par le passage chez les animaux ou par l'action du sérum anti-R; par John (205) (1927) qui remarqua la présence de formes R dans le liquide céphalo-rachidien, dans le pus de mastoïdites, et de divers empyèmes.

On a observé, de même, que quelques forme R ne sont pas susceptibles de réversion (Griffith, Dawson, Martin, Avery, Osvald, Dawson et Martic), Griffith, en étudiant particulièrement le déterminisme du phénomène de la réversion des formes R en S est parvenu à des résultats vraiment exceptionnels, et qui mettent sérieusement en doute la distinction du pneumocoque en différents types. D'après ces expériences il paraît, que, pour obtenir la réversion, soit nécessaire en même temps la présence de pneumocoques tués par la chaleur. En inoculant une souche attenuée R du type II, dans le tissu sous-cutané d'une souris, avec une dose considérable de pneumocoques virulents du type-I (tués par chauffage à 60° pendant 2 h.), il a obtenu de cet animal mort par septicémie pneumococcique, une souche S du type I. De la même façon, il a obtenu des formes R du type I de souches S du type II; des souche S du type III de la forme R du type I et II et des souche virulentes S du type I et II, d'une souche R du type III. L'explication de telles transformations, serait à recercher dans le fait que la forme R, par la perte de sa capsule et de sa substance typo-spécifique, subit une modification de sa constitution antigènique, mais pourrait une des trois substances typo-spécifiques mise á sa disposition et acquerir ainsi les caractères d'un des types de pneumocoques. Ces résultats n'ont jamais été obtenus que « in vivo », et jamais « in vitro ». Les travaux de Griffith, abordent un problème d'une importance tellement grande qu'ils nous laissent perplexes même aujourd'hui. Plusieurs bactériologues hésitent à accepter sans réserves, que le recouvrement de la virulence et des capsules de la forme dégradée, puisse survenir dans les circonstances que nous venons de décrire. Des démonstrations ultérieures, et une méthode qui puisse re-

produire ces résultats avec une plus grande régularité, sont donc nécessaires (Arkwright).

D'une importance scientifique, mais aussi d'une grosse importance pratique pour la vaccino-prophylaxie de l'infection tuberculeuse, sont les travaux de Petroff, Branch et Steenken (206, 207) (1929-1930) sur la dissociation du Bac. tuberculeux et particulièrement du B. C. G. qui comme les autres germes, ont été dissociés dans la forme S (normale) virulente et dans la forme R (variée) a virulence attenuée (Petroff) (208) (1927).

Il paraît que le B. C. G. soit une forme R très stable du bac. tuberculeux, qui, sur des milieux particulièrement adaptés (culture sur milieu à l'oeuf contenant des substances faiblement antiseptiques, comme le violet de gentiane, au lieu de pomme de terre glycérinée et biliée de Calmette et Guerin) peut se dissocier dans des formes S plus virulentes. Les travaux des trois auteurs susdits ont été confirmés par Kraus (209) (1929) (sur des milieux qui lui ont été fournis par Petroff) par Uhlenhth et Seiffert (216) (1930), par Hutyra (211) (1929), par Dreyer et Vollum (212) (1931), par Reed (134) (1932) et par d'autres. Par contre, le même Kraus (209) (1929) avec des cultures dissociées dans son laboratoire, Elbert et Gelbert (213) (1930) Nechtadimenko, Odrina, Syssak et Anguenitzky (214) (1930), Piasecka-Zeyland (215) (1929), Tzerknovitzer (216) (1903), Christison (217) (1932) et d'autres ne sont pas arrivés à des résultats vraiment démonstratifs.

L'importance de cet argument et le désaccord des résultats montrent la nécessité de recherches ultérieures. La plus grande utilité de cette étude consiste dans l'identification des colonies variées. Il semble que la dénomination S et R ne corresponde pas exactement à ce but, si bien que Petroff a plutôt conseillé les noms de « sensitif » et de « résistant » proposés par Hadley (1927) comme mieux appropriés. Il existe une réelle difficulté dans l'individualisation des types de colonies tuberculeuses; cela résulte du fait que Petroff (218) (1929) dans les colonies indiquées par Kraus (1929) reconnut comme type S, seulement un type R intermédiaire, et expliquait ainsi la contradiction relevée dans les recherches de celui-ci.

Même dans des recherches sur la dissociation du B. Koch qui sont en cours dans notre laboratoire, nous avons remarqué combien il est difficile (beaucoup plus que de dissocier des colonies d'un type varié) d'obtenir de celles-ci des souches ayant des caractères stabilisés.

Nungester (157) (1929) dans un travail sur la dissociation du bac. du charbon, a trouvé que le type S (varié) de ce germe présentait en dehors d'une dégradation de ses différentes caractéristiques biologiques

et biochimiques, un dégré de virulence réduit vis-à-vis du type R (normal). Dans ses recherches, il individualisa, de même, deux autres types de colonies; un type « mucoïde » (M) présentant des caractéristiques qui se rapprochaient ou de la forme R (Fm) ou de la forme S (Sm), et un type « fantôme » (P) présentant des caractéristiques rugueuses (Rp) ou lisses, (Sp). Ces types même lorsqu'ils se rapprochaient morphologiquement de la forme S présentaient une réduction de leur dégré de virulence. Mazzetti (1932) a confirmé les résultats de Nungester, par des expériences sur une souche asporogène et atténuée, tandis qu'en travaillant sur des souches fortement virulentes qui offraient une dissociation très distincte en colonies R S, et en colonies intermédiaires, il n'a pas réussit à distinguer aucune différence dans la virulence et dans les caractères biochimiques des types S. L'auteur admet que le stimulant très faible qu'il a employé et la haute virulence de ses souches, puissent avoir déterminé des résultats moins précis, que ceux de Nungester et d'autres auteurs (Preisz (91), Bail et Flaumentaft (92), Gratia (219), 1921, etc.).

De cette brève revue des travaux les plus importants sur cet argument, on doit penser que, en règle générale, à la variation du type de la colonie, s'associe une variation du dégré de la virulence.

Moins défini, nous apparaît le rapport, entre le type des colonies dissociées, et leur pouvoir toxigène. C'est aussi que les observations à ce propos ne sont pas si nombreuses que celles concernant la virulence. Les études plus significatives ont été accomplies sur le Bac. de la diphtérie; Bernhardt (27) 1915, Heinmann (220) 1917, Crowell (182) 1925, Hadley (1*) 1927; sur les Streptocoques: Cowan (221) 1927; sur quelques anaérobies: Mc. Intosh, et Fildes (222) 9118, Scippen (223) 1919; Reddish (224) 1921, Nennington (225) 1922, Hall (226) 1926; sur le Bac. dysentérique Shiga; Frejgin (227) 1923 et sur le Bac. de Aertyck: Ibrabhin et Schütze (228) 1928. Ces auteurs ont obtenu et décrit des variations dans le pouvoir toxique des différentes souches, selon le type des colonies. Beaucoup de ces recherches, bienque antérieures à celles d'Arkwright, et par suite sans rapport strict avec les formes R ou S peuvent être comprises, selon toute probabilité, dans ce chapitre.

Le plus souvent, ces travaux décrivent une diminution du pouvoir toxique des souches provenant de colonies assimilables à la forme R. d'Arkwright, vis-à-vis du type normal, et décrites aujourd'hui comme du type S. Mais il existe des exceptions même à cette argumentation générale. Par exemple, deux variantes du Bac. tétanique, l'une mobile et l'autre immobile, semblent être également toxigènes Fildes (229), 1917 et aussi pour le bac. dysentérique Shiga, il parait que la variante R ait parfois, le même pouvoir toxigène que la variante S.

La dissociation en rapport avec les propriétés antigèniques des variantes. — En même temps que les études sur le dégré de virulence, s'est développé, pendant ces dernières années, une courant de recherches systématiques, sur les variations des propriétés antigèniques des culture microbiennes dissociées. Ces recherches, comme les premières, ont conduit à des résultats très intéressants non seulement au point de vue scientifique, mais aussi au point de vue pratique. Les études en question ont eut comme base principale, le travail de Weil et Felix (52) (1917) sur le B. proteus, analogue à celui antérieur de Smith et Reagh (230) (1903) et à celui d'Arkwright (54) (1921). Smith et Reagh, en expérimentant sur le B. suipestifer, ont pu mettre en évidence deux antigènes distincts qui donnaient lieu à la formation de deux espèces correspondantes d'anticorps agglutinants. Avec les souches mobiles, les animaux inoculés formaient des agglutinines pour la substance ciliaire et pour la substance du corps bactérien, tandis qu'avec les souches immobiles, on avait seulement production d'anticorps agglutinants pour la substance du corps bacillaire. Cette dualité antigénique se manifestait par deux sortes d'agglutinations: l'une en gros flocons correspondant à l'antigène ciliaire, la deuxième en petites granulations correspondant, à l'antigène du corps bactérien. Ces résultats furent confirmés par les épreuves d'absorption, qui montrèrent dans le premier des deux sérums spécifiques deux sortes d'anticorps, et dans le deuxième, une seulement. Le sérum anticiliaire agglutinait relativement peu les souches non mobiles, tandis que le sérum antisubstance du corps bacillaire était actif aussi bien vis-à-vis de souches mobiles que vis-à-vis de celles immobiles. Ces auteurs ont admis, cependant, la présence de deux sortes d'antigènes l'un « somatique » et l'autre « ciliaire ».

Quatorze ans après, Weil et Felix, en étudiant la relation entre le typhus exanthématique et la souche Proteux $X19$ ont pu distinguer dans celle-ci deux sortes de colonies: un type correspondant à la colonie normale, avec tendance à l'étalement en cultures, qu'il appelèrent H (H = Hauch, halo) et un à développement plus limité qu'ils appelèrent O (O = ohne Hauch, sans halo).

Le sérum de malades de typhus exanthémathique agglutinait bien les souches O, donnant une agglutination du type granulaire, tandis que le sérum anti-H obtenu artificiellement, agglutinait les émulsions selon le type d'agglutination à flocons. Par des épreuves d'abosorption ils ont démontré que le type O n'absorbe que ses propres agglutinines, tandis que le type H peut absorber les agglutinines de l'un et l'autre type: O et H.

Le type O contient donc un seul antigène, dit somatique ou antigène O, tandis que la forme H, outre l'antigène de la forme O, en possède en plus un second, dit flagellaire, ou antigène H.

L'antigène H est thermolabile (il est détruit en une heure à 80°-100°); l'antigène O n'est pas modifié par la même traitement (Sachs et Schlossberger (231) 1919). Le changement du type H en O ne survient pas soudainement; il passe par des formes intermédiaires. Il est important, en pratique, de savoir que la variante O peut devenir très stable et pratiquement irréversible, et qu'elle est la seule à être agglutinée par le sérum des malades de typhus exanthématique. Des recherches ultérieures ont été étendues par l'école de Weil, au Bac. typhique, au groupe des salmonella, au V. cholérique et à quelques anaérobies.

Arkwright, en 1921, dans ses premières recherches sur la dissociation, put démontrer que, tandis que les souches R et S sont agglutinées toutes les deux par des sérums spécifiques ordinaires, lorsqu'elles sont inoculées separément aux animaux, elles produisent des sérums spécifiques pour chacun des types R et S. Cette spécificité eut une confirmation presque complète par les épreuves d'agglutination croisée. Dans les épreuves d'absorption, les souches S absorbent les agglutinines S en laissant les agglutinines R, et vice-versa.

Arkwright put encore affirmer que, tandis que les formes S produisent un immunité évidente chez les animaux, les formes R ne possèdent pas du tout, ou presque pas, ce pouvoir immunisant.

On voit que ces trois travaux sont intimement liés entre eux.

Ces résultats ont été confirmés et élargis par des recherches analogues sur d'autres espèces bactériennes: Weil et Felix (232) 1920; Weil (223) (1921;) Felix (234) 1924; Felix et Olitski (235) 1926; Braun et Nodake (236) 1924; Orcutt (200) 1924; White (110) 1925-26; Pijper (237) 1923-1930; Arkwright et Goyle (56) 1924; Goyle (11) 1926-27 (238); Arkwright (239) 1928; Arkwright et Pitt (240) 1929); pour ne citer que les travaux les plus connus.

Hadley (1*) (1927) et Dible (4*) (1929) ont consacré de larges commentaires à ces analogies et aux possibilités d'assimiler les forme H et O de Weil et Felix à celles R et S d'Arkwright. Il paraît que dans ces études il n'est pas possible d'atteindre à une identité parfaite. Tandis que pour Weil et Felix la forme H est la forme normale et la forme O la forme variée, pour Arkwright outre le type R, le type S peut aussi, être varié.

Arkwright et Goyle (56) (1924) sont arrivés à cette conclusion de considérer S = O et R = H; mais les études de De Kruif, Griffith et Julianelle et d'autres ont poussé Goyle (111) (1926) à admettre deux types de colonies lisses: S normale et S variante, de façon à pouvoir identifier S avec H et conclure à l'existence de deux types d'antigène thermostabile; l'un spécifique d'espèce: O, de Weil et Felix; l'autre R, caractéristique des cultures rugueusés, et, en cela, commun à un plus grand nombre de variétés.

Cette même conception a poussé Schütze (241) (1922-1928) à admettre un « cosmopoliténisme » antigénique de la forme variante R.

Arkwright (1927) considèáe de la façon suivante l'identité des diverses formes:

(S) lisse normale = H + O
(S) lisse variante = O ± r ± h
(R) rugueuse variante = R ± h ± O.

(Les lettres majuscules et les minuscules montrent respectivement la valeur antigénique plus ou moins grande.)

Il paraît donc que le type S d'Arkwright peut être identifié en général, avec le type H de Weil et Felix; mais certaines formes variantes, lisses, peuvent être identifiées au type O qui serait un type intermédiaire entre S et R, tandis que la forme R serait une variante qui n'aurait pas été décrite par Weil et Felix.

Arkwright (198) (1929) du moins, pour ce qui regarde le B. coli, le Bac. typhique et le paratyphique admet les quatre variantes suivantes:

1) Souches normales mobiles, isolées des malades, et produisant un trouble en bouillon, et colonies lisses = S. M. (lisses, mobiles).

2) Variantes lisses non mobiles = S. N. M. (lisses non mobiles).

3) Variantes rugueuses mobiles = R. M. (qui sont mobiles et qui donnent des colonies à caractère rugueux).

4) Variantes rugueuses non mobiles = R. N. M.

Comme on l'a déjà dit, les formes mobiles contiennent principalement deux antigènes, l'un ciliaire (pour les cils) et l'autre somatique pour le corps bactérien; les formes immobiles contiennent seulement l'antigène somatique. La virulence, la bactériolyse et le pouvoir bactéricide ainsi que la fixation du complément sont en rapport plus spécial, avec la nature de l'antigène somatique.

Variations des antigènes ciliaire et somatique. — Arkwright dans son rapport au Congrès de Microbiologie de Paris de 1930 a pris ce chapitre en considération particulière. L'antigène ciliaire et ses agglutinines ont une grande importance dans la classification des composants du groupe typho-coli et des salmonella. Des sous-types et des types variés, dans leur constitution antigénique, peuvent gèner le travail du chercheur.

Quelques uns sont des types stables et quelques autres non. On considère comme des types stables les variantes immobiles ou O des salmonella et de certains anaérobies (tétanos), dans lesquelles un, parmi les deux ou les plusieurs antigènes ciliaire, est perdu (Schütze (241), 1922).

On doit remarquer que la distribution des partigènes de l'antigène somatique parmi les divers membres d'un même groupe, est plus uniforme

que ceux de l'antigène ciliaire. Aussi la classification en groupes effectuée avec la premier est elle plus large que celle effectuée avec la deuxième.

Mais ce fait aussi n'a qu'une valeur relative, puisque tandis qu'il est valable pour le groupe des salmonella, c'est tout à fait le contraire pour le B. proteus. Quant aux germes dépourvus de cils, on ne trouve chez eux que l'antigène somatique; les variations de celui ci sont donc, des plus intéressantes à étudier.

A la variation antigène S → R on peut probablement attribuer la perte de la virulence des souches conservées au laboratoire. Il paraît aussi qu'un tel changement soit plus facile dans des milieux à fort pouvoir nutritif que dans ceux à taux relativement bas, tel que du bouillon délayé 4-5 fois avec de l'eau (Arkwright). De même les formes R, obtenues des formes S par action du sérum anti-S somatique, perdent leur virulence, tout en gardant, leur vitalité végétative.

D'une importance particulière est l'étude de l'antigène somatique chez les espèces capsulées (pneumocoque, et pneumobacille) étant donné que les souches dégradées, c'est à dire celles qui ont perdu leur capsule, et par cela même « la substance soluble typo-spécifique », ne peuvent plus être distinguées sérologiquement.

On a démontré aussi, au moyen d'analyses chimiques et sérologiques, la ressemblance antigènique de la capsule de tels germes avec l'antigène somatique d'autres microbes, tels que, par exemple, le Bac. typhique (Landsteiner et Furth (242) 1927).

On doit donc penser qu'il peut se faire, « in vitro » et « in vivo », dans l'ensemble des caractères antigénique, des variations qui ont la plus grande importance pour le diagnostic et la classification des germes. D'après Ledingham, elles seraient limitées aux formes S⟶R et H⟶O ou aux formes à « phase » d'Andrewes, qui a recherché un autre aspect du problème de la dissociation, par rapport aux propriéèts antigèniques (190) (1922-1925). Cet auteur obtint des résultats intéressants, même pour le diagnostic sérologique des composants de certains groupes dont la classification présente de nombreuses difficultés (Salmonella).

Andrewes, en exécutant des épreures d'agglutination avec des sérums ultra-spécifiques, pour différents types de Salmonella (bac. paratyphique B. C.: bac. Aertryck et bac. Newport) sur de jeunes cultures en bouillon, obtenues de colonies particulières de ces germes, put voir se manifester deux phénomènes distincts:

a) la culture examinée était insensible aux agglutinines de groupe, mais sensible aux agglutinines mono-spécifiques.

b) la culture était formée par des individus sensibles seulement aux agglutinines de groupe.

Andrewes, remarquant dans toutes les épreuves un type d'agglutination en flocons, admit uq'il ne se trouvait pas en présence des deux agglutinines de Weil et Felix.

Il indiqua ce phénomene sous le nom de « phase spécifique » et « phase aspécifique », en admettant que les souches dont il s'agit, étaient « biphasiques ».

Ce phénomène ne se trouve en relation avec aucune dissociation du type des colonies. Les deux phases peuvent se trouver en des proportions différentes suivant les conditions culturales de la souche en examen et elles peuvent subir des variations de nombre l'une vis-à-vis de l'autre.

Dans quelques cas, on a obtenu l'une des deux phases, à l'état de pureté, surtout en cultivant les souches en présence d'antisérums propres à ce but (Scott (243), 1926). On en tire, comme corollaire pratique, que l'on peut obtenir des antigènes et des sérums spécifiques correspondanrs qui ne contiennent pas d'agglutinines de groupe, et qui peuvent être de grand secours pour la pratique du diagnostic d'espèces.

Réversion de la forme variée. — Quelques auteurs se sont prononcés pour la stabilité des variantes qu'ils avaient obtenues, d'autres au contraire, ont observé un retour plus ou moins rapide à la forme normale. Cette question reste donc toujours pendante. Ce processus varie facilment d'une espèce bactérienne à l'autre, et, peut-être aussi, d'une souche à l'autre suivant que le stimulant de la dissociation a agi avec plus ou moins d'énergie et pendant un temps plus ou moins long.

Selon toutes probabilités, les mêmes stimulants pour la transformation de la forme normale en une forme variée peuvent agir en dissociant ultérieurement cette dernière vers la forme normale, on a pourtant décrit des variétés résistantes à ces action et jugées irréversibles.

Jusqu'à présent, en parlant, des formes intermédiaires, nous avons mentionné seulement celles S R ou R S et d'autres semblables, en nous basant uniquement sur leur dégré d'apparence lisse ou rugueuse, c'est à dire en nous appuyant sur une base purement morphologique. Mais prenant, maintenant en considération la constitution antigènique des formes variantes et de la forme normale, il est plus juste d'admettre que le processus dissociatif survienne dans la direction S→O→R, c'est à dire en admettant la présence d'une forme intermédiaire (O) à antigène thermostabile, qui d'après les points de vue de White, Goyle, Arkwright et Hadley, est spécifique dans les formes intermédiaires. Si cette proposition doit être admise pour la transformation de la forme normale en forme variée, pour le moment on n'a pas encore démontré que le processus de réversion suive l'ordre inverse. Il semble, au contraire, que la forme intermédiaire O

soit tout simplement sautée, et que l'on ait un retour direct de la forme variée à la forme normale.

Si quelques auteurs (Nungester, Mazzetti et d'autres) ont démontré, que sous l'influence de divers facteurs stimulants, on peut mettre en évidence une régression de la forme variée vers la forme normale, avec présence de formes intermédiaires, il reste encore, cependant, à voir si ces dernières sont bien de véritables formes intermédiaires, puisqu'elles n'ont été considérées que du point de vue morphologique (R S ou S R et d'autres semblables), et non du côté pouvoir antigènique (O) qui est le plus important pour la définition de la forme intermédiaire.

Enfin, étant donné qu'il y a des germes qui se développent dans leurs cultures normales sous la forme rugueuse, on ne peut lier au symbole R la conception d'une forme varièe. En effet, dans quelques cas, R. indique la forme normale et S. la forme varièe. En réalité, pour bien comprendre cas exceptions, il serait nécessaire de poursuivre les recherches en vérifiant les rapports entre les propriétés antigèniques de cas diverses formes.

Dissociation et Bactériophage.

Le phénomène bactériophagique en provoquant l'apparition de cultures secondaires, présente une particulière importance pour la dissociation bactérienne.

En effet, i'apparition de ces cultures survient dans des conditions déterminées, c'est à dire lorsqu'on fait agir le principe lytique à de faibles concentrations, et lorsque son action est artificiellement inhibée, par l'emploi, par exemple, de milieux acides (Gratia) (291). Pour notre sujet le fait suivant est important: les cultures secondaires présentent de remarquables altérations du côté morphologique et biologique, par comparaison avec la culture « normale » sur laquelle le principe lytique a agi.

On peut donc dire que la bactériophage donne lieu à une véritable dissociation caractèrisée de la culture primitive.

D'Hérelle a considéré ce fait comme en relation avec une adaptation du germe à l'action lytique, tandis que Gratia l'a rapporté a un fait de sélection.

Les rapports entre le bactériophage et la dissociation sont considérés comme très étroits, par d'Hérelle, de sorte qu'il affirme de nouveau (248) que « ..... les souche ultrapures (sans bactériophage) ne présentent aucune « modification et elles restent stables à travèrs de nombraux passages « sur des ,, milieux artificiels ,, et que la contamination d'une souche « ultrapure, par un bactériophage, donne origine à des souches variées « qui restent indéfiniment des porteuses de bactériophage; que, du mo- « ment de la contamination, elles présentent des variations en tous sens;

« chacun des caractères en variant de par soi même constitue une entité « distincte, si bien que le nonbre des variantes possibles, provenant toutes « d'une seule bactèrie en particulier, demeure indéfini ». D'Hérelle admet, par conséquent que « les transformations bactériennes sont un cas parti- « culier d'un phénomène déjà bien connu, comme celui des mutations « sous l'action d'une symbiose ».

Ces conceptions formulées dés 1926 par d'Hérelle, dans son traité sur le Bactériophage, ont été à leur temps, amplement réfutées par Hadley (1927) et par d'autres auteurs. On peut bien en conclure qu'aujourd'hui encore, cette discussion demeure ouverte.

De l'action du bactériophage sur une culture microbienne dérivent généralement, ou des souches uniquement bactériophago--résistantes ou des souches qui en dehors de leur résistance à la lyse, ont la faculté de transporter avec elles mêmes, par un mode d'action mal défini, mais peut être analogue à un processus symbiotique, le principe lithique. Le fait se vérifie un temps plus ou moins long ou même indéfini (souches lysogénétiques), sauf lorsqu'on intervient par des moyens spéciaux (repiquage répétés, cultures en présence de sérum antibactériophagique, etc.). De telles culture possèdent une insuffisnace de facultés reproductives, et elle ne peuvent pas être agglutinées par les sérums spécifiques pour la souche originelle (D'Herelle).

D'après D'Hérelle lui même, et d'autres auteurs, l'action du bactériophage aurait le pouvoir de donner lieu à une sèrie très nombreuse de souches variées, parmi lesquelles l'apparition de colonies avec des propriétés mucoïdes prédomine par sa fréquence.

Pour le problème de la dissociation, il est intéressant de connaître si ces souches, provenant des cultures secondaires, peuvent être identifiées, ou au moins rapprochées, des formes R décrites par Arkwright. Il paraitraît, en effet, qu'on puisse les rapprocher par certains caractères des formes R; mais les expériences ne concordent pas toutes sur ce point, puisqu'on a démontré que les cultures secondaires, lyso-résistantes, peuvent être plus virulentes que les culturex originales. Le fait même que les formes R présentent une résistance à la lyse, ce que l'on croit certain, paraîtrait être contre-dit par certaines expériences d'Arkwright. D'autres contributions à cette question, spécialement sur la distinction de diverse types de bactériophage par rapport à l'identification des cultures secondaires obtenues avec les types S et R, ont été apportées par Graita (201) (1923) et Hadley (1*) (1927). Burnet (249) (1927) établit une relation entre l'action lytique du bactériophage et l'absence ou la présence de l'antigène O (thermostabile) dans les cultures microbiennes.

En résumé. on peut donc dire que, quelque ce soit la véritable nature du principe qui engendre le phénomène de Twort-D'Hérelle, il est certain,

que celui ci doit être pris en haute considération, et regardé comme un des stimulants les plus actifs de la dissociation, quelque ce soit le résultat ou la direction dans laquelle celle-ci se développe.

Même sans arriver aux postulats extrêmes de D'Hérelle, le fait de la quasi ubiquité du bactériophage dans le milieu naturel et son aptitude à produire un processus dissociatif évident donne l'idée de l'influence que peut avoir ce principe inconnu dans la production des variations bactériennes.

Pettenkoferies.

Les études de Kuhn et Sternberg, connues par une série de publications commencées en 1919, ont été réunies dans une revue parue en 1931 (250).

Ces recherches occupent une place à part parmi les études sur la biologie des bactéries. Mais, puisqu'elles ont été inspirées par le pronlème du pléomorphisme et par les rapprechements que les auteurs eux mêmes en ont fait avec les études sur les dissociations, il nous semble qu'elles doivent être rapportées ici même.

Ces auteurs, en 16 ans de recherches, ne sont pas arrivés à confirmer l'existence d'un véritable pléomorphisme bactérien; mais ils ont remarqué que les bactéries en bâtonnet (bacilles, vibrions, et spirilles) qu'ils appellent formes B, peuvent se transformer en éléments en coccus (formes C) qui seraient des éléments de résistance. A coté de ces deux formes principales, on peut trouver des figures filamenteuses (forme F) qui en se réunissant entre elles pour constituer des pelotes, réussissent à donner l'impression de formes dendritiques (formes D).

En substance, il existerait donc chez les bactéries un véritable dimorphisme fourni par les formes B et C, qui ne se multiplient que par division transversale. Même les bacilles sporogènes pourraient produire des formes C.

En dehors de l'affirmation de cette morphologie variée, les recherches de K et S auraient démontré, chez les cultures bactériennes, l'existence normale d'autres élements vivants qui rappellent les protozoaires: les pettenkoféries. Les pettenkoféries se multiplient une fois seulement par division, puis elles produisent des kystes avec des spores qui pénètrent dans les formes B en les détruisant; elles ne pénètrent jamais, au contraire, dans les formes C auxquelles serait ainsi confiée la conservation de l'espèce. Tous les phénomènes observés en bactériologie, seraient donc sous la dépendance des spores des pettenkoféries.

Le fait de ces deux cycles vitaux qui se développent ainsi, l'un près de l'autre, produirait une quantité de tableaux qui pourraient difficilement s'interprèter sans une exacte connaissance des deux cycles. La technique

dont K et S se sont servis pour mettre en évidence les formes qu'ils ont décrites est très compliquée.

Comme on peut très bien l'imaginer, ces auteurs, puisqu'il s'agissait de faire des observations de morphologie fine, ont employé toute une série de méthodes particulières pour la fixation et la coloration des préparations bactériennes.

Pour la fixation, ils ont employé la méthode de fixation sur gélose d'après v. Wasielewski et Kuhn (251) (1914); le procédé consiste essentiellement dans la fixation des colonies en même temps que la gélose sur laquelle elles se sont développées. Par une série de manipulations la gélose est ensuite éliminée et il ne reste que les élements cellulaires qui, pour ce qui se rapporte aux pettenkoféries, sont colorés de préférence par la méthode nucléaire de Feulfen (252).

Comme milieux de cultures pour les pettenkoféries les Au. recommandent l'emploi d'une gélose spéciale, légèrement acide (pH = 6,60) avec adjonction de 2,5 gr. de chlorure de lithium par 100 cc. Pour obtenir les formes C, il est utile de faire agir sur les germes, pendant plus ou moins lontemps des substances chimiques particulières à action nocive, telles que l'ammoniaque et l'acide carbonique.

L'apparition des formes F est facilitée par l'adjonction de substances colorantes: par exemple pour 200 cc. de gélose à pH = 6,6, ajouter 3 gouttes d'une solution d'1 gr. de cristal-violet dans 50 cc. d'eau distillée. Pour ce qui concerne les formes B, ils les décrivent en bâtônnets, droits ou courbés qui se colorent uniformement en bleu, avec le bleu de méthylène, et en rouge avec la fuchsine.

Les formes F ne seraient pas de véritables filaments, mais une série de bactéries allignées. Surtout, par l'action des pettenkofèries qui les ont envahies, les formes F groupées peuvent prendre l'aspect dendritique (formes D): même les formes ramifiées décrites chez les B. diphtériques et tuberculeux seraient dûes à l'action des pettenkoféries.

Les formes C ne se produiraient ni par segmentation ni par transformation totale du corps bacillaire: elles apparaitraient, au contraire, précisément, dans la cellule bactérienne et seraient identiques aux granules de Babès-Ernst, aux granules polaires, aux granules de volutine. Dans le bac. tuberculeux les formes C seraient identiques aux granules de Mircoli-Much.

Les formes C puisqu'elles apparaissent, lorsque la culture se trouve dans des conditions défavorables (développement sur gélose au lithium et présence de pettenkoféries) doivent être considérées comme des eléments de résistance. Les auteurs auraient réussi de même à obtenir des cultures pures de formes C des souches suivantes:

45 souches de B. coli	1 souche de proteus X. 19
1 Vibrion Metschnikoff	2 souches du B. Shiga-Kruse
2 souches typhiques du rat	5 souches typhiques
1 souche suipestifer	1 souche de spirillum volutans
1 souche suisepticus	1 souche de charbon
4 souches de diphtérie	1 souche pseudocharbonneuse
1 souche de B. proteus	1 souche de bacille tuberculeux.

Les colonies constituées par des formes C sont incolores, petites, délicates, lisses, n'ayant pas l'aspect de porcelaine. Pour la morphologie de leurs élements, elles peuvent aussi se confondre avec des colonies de streptocoques.

Par opposition à la structure régulière et ordonnée des colonies B, celle des colonies C est irrégulière et désordonnée.

Dans les colonies C se trouvent des éléments tout à fait petits, qui peuvent filtrer à travers la bougie de Berkefeld (N) ainsi que les auteurs ont constaté par des cultures C de B. typhique, de diphtérie, de B. coli et de B. suipestifer. Les auteurs n'excluent donc pas la présence d'un stade invisible et filtrable des bactéries. Les formes C de divers types bactériens montrent de remarquables différences entre elles. Les formes C du B. tuberculeux qui poussent comme de petites colonies anguleuses d'une couleur dorée, se colorent en bleu par le liquide de Ziehl.

Parmi les caractéristiques des formes C, il faut remarquer que les cultures isolées de cultures fraiches Gram + deviennent nettement Gram —; en outre, les formes C sont immobiles même si elles proviennent d'éléments mobiles, et elles sont avirulentes, même si elles proviennent de cultures virulentes (typhus des rats, etc.).

La gélose au lithium, tandis qu'elle facilite l'apparition des formes C, ne se prête pas à la culture de celles-ci, pour laquelle sont plus indiqués les milieux ordinaire.

Sérologiquement, les formes B ne sont pas agglutinées par le sérum antiformes C de la même souche.

Des formes C se reproduisent ensuite, et particulièrement à la marge des colonies: les formes B, les pettenkoféries apparaissent de nouveau, et le double cycle évolutif des bactéries et des pettenkoféries recommence à se développer.

K. et S. remarquent qu'on ne doit pas s'étonner du fait que beaucoup d'auteurs ont cru avoir vu des noyaux dans les bactéries: cela s'explique en pensant que dans ces bactéries peuvent se trouver: 1) des spores des pettenkoféries; 2) des spores des pettenkoféries en évolution; 3) des formes C en évolution. Les bactéries au contraire, d'après les recherches de K. et S., n'ont pas de noyau ou bien elles se colorent d'une manière diffuse par la coloration nucléaire de Feulgen.

Les petites spores des pettenkoféries, une fois pénétrées dans une

forme B, se développent aux dépens du protoplasma bactérien, en provoquant une augmentation de volume de la cellule, qui finit par se rompre et laisser en liberté les jeunes pettenkoféries.

Les pettenkoféries seraient des éléments semblables aux protozoaires; par la coloration nucléaire de Feulgen, on réussit à voir en elles des structures qui représentaraient le noyau. Les pettenkoferies se multiplieraient par division directe donnant origine à deux et peut être à plusieurs individus.

Les pettenkoféries peuvent former des kystes entourées par une enveloppe muqueuse, qui rend difficile la fixation; dans celles- ci apparaissent de nombreux et tout petits granules: les spores. À l'éclatement des kystes, les spores s'échappent et vont à la recherche les bactéries environnantes; si les kystes se trouvent au milieu des formes B, on constate dans la distriburion des bactéries voisines la constitution d'espaces vides, arrondis, des cultures avec bactériophagie.

La formation des kystes se ferait par la fusion de deux éléments; les auteurs jugent ce processus de nature sexuelle.

Les pettenkoféries peuvent être cultivées de façon durable sur gélose au lithium, à laquelle on ajoute du sang de mouton; dans ces cultures on trouve des formes C.

Dans les cultures de pettenkoféries ainsi que dans celles qui présentent le phénomène de D'Hérelles, il y a des filaments, qui doivent être interprétés comme des formes sans vitalité constituées par l'enveloppe muqueuse de pettenkoféries (253).

Les pettenkoféries ne sont pas des ennemis des bactéries, mais elles vivent en symbiose continuelle avec ces dernières, et on verrait ainsi tomber l'espoir de D'Hérelle, qui voudrait arriver à combattre l'infection en employant des filtrats actifs. Les pettenkoféries ont été ainsi dénommées, parce que Pettenkofer, supposa, précisement, l'existence d'un substratum hypothétique X qui aurait une grande importance dans la biologie des bactéries. Le substratum X pourrait donc être comparé aux pettenkoféries.

***

En passant en revue la littérature sur les variations K. et S. trouvent que beaucoup d'autres auteurs ont remarqué l'apparition de formes en cocci dans des cultures bactériennes (Almquist, Fuhrmann, Hort, Löhnis, Bernhardt, Enderlein, Prell, Lutz, Mellon, Hadley, Haag, Oesterle et Stahl Cunningham, v. Klinckowström).

D'une spéciale importanco sont les considérations que K. et S. font à propos des colonies R. et S. Pour des auteurs, les colonies R seraient des cultures impures de formes C; et cela expliquerait beaucoup de

données qui contrastent dans les recherches de divers anteurs. Les assertions de K. et S. ont été l'objet de nombreux contrôles; Platz (254), et V. Vagedes (255), tout en remarquant les formes décrites par K et S, les considèrent comme des phénomènes d'involution ou de modification.

Dignes de remarque sont les recherches de Klineberger (256) qui, tout en confirmant les données de K. et S., juge les formes décrites comme attribuables à l'action stimulante produite sur les bactéries par les sels toxiques ajoutés aux milieux. K. et S. objectent, cependant, que les pettenkoféries peuvent se trouver même dans les cultures sur des milieux normaux. Un autre contraste entre Klineberger et K S existe dans la valeur différente attribuée aux formes C qui, comme nous avons déjà, vu ont, pour ces derniers, une individualité nette vis-à-vis des formes B.

Les données de K. et S., par contre, ont'été confirmées, par Ziegenspeck (258) et Wilke (258). Ziegenspeck et Wilke (260), décrivent chez les azoto-bactéries deux cycles vitaux, l'un près de l'autre; l'un est le cycle simple des bactéries, l'autre commence avec la formation d'un symplasma, qui, 'daprès Ziegenspeck, devrait être considéré comme une pettenkoférie du type plasmode. De ce symplasma prendraient origine de petits cocci qui s'allongeraient en bâtonnets; ces cocci et bâtonnets ne seraient pourtant pas des éléments bactériens. De ceux-ci on passerait graduellement à une quantité de formes jusqu'aux kystes; dans ceux-ci ces auteur voient les « gonidianges » de Löhnis. Dans ces Kystes se forment de petits éléments, qui vont ensuite se fixer aux cellules bactériennes, et qui se multiplient dans celles-ci en les détruisant, puis s'echappent ensuite en reconstituant un symplasma.

Ziegenspeck et ses collaborateues, sont d'avis que Almquist, Löhnis et Enderlein, ont décrit comme cycle des bactéries, le cycle des pettenkoféries.

K. et S. n'ont pas pû confirmer quelques figures vues par Z: la formation de bâtonnets, de cocci, le plasmode, et d'autres encore. Le rapporteur, au cours de quelques recherches sur la dissociation d'une souche de V. cholérique, parvint à obtenir des colonies qui présentaient des caractères cérébroïdes. Dans quelques unes de celles-ci, même après seulement 48 h. de développement, il a trouvé toute une gamme des formes B, C, F, D de K. et S. et aussi des formations analogues aux pettenkoféries. Par des isolements en plaques il obtint, d'une de ces colonies cérébroïdes, une colonie exceptionnellement étalée (3 cm. environ de diamètre) avec des sinuosités et des veines très caractéristiques. Cette même colonie, dans des isolements successifs a reproduit uniquement des colonies de son type C; répiquée en bouillon, elle n'a donné que des formes D, qui après 48 h. se résolvaient en B, C, F.

Ces épreuves ont été faites sur gélose et bouillon normaux, avec un pH = 7,2.

Dans des préparations colorées par la méthode de coloration des cils, on en a trouvé de caractéristiques en queue de porc, même dans les formes C et dans les formes F. On constait que ces dernières résultaient d'éléments B en chaîne, de chacun desquels jaillissait latéralement un cil. Les formes kystiques avec des granules étaient trés visibles.

Toutes ces formes décrites étaient réversibles, et difficiles donc à interprèter.

V. — L'importance des etudes sur la variabilite pour l'epidemiologie, l'immunologie et le diagnostic bacteriologique.

Lorsque l'on commence à se familiariser avec le phénomène de la dissociation bactérienne, il apparaît étrange que pendant un temps plus ou moins long, selon les différents pays, on n'ait pas pris plus tôt en considération les caractères morphologiques atypiques des colonies qui acquièrent souvent des aspects très différents des formes ordinaires.

On peut croire que l'explication en est surtout dons une grande méfiance vis-à-vis la première conception naegélienne erronée du « pléomorphisme », qui était devenue tout à fait chaotique par sa simplicité même.

L'idée de la constance des espèces, qui s'était affirmée par opposition, acquit un dogmatisme d'autant plus rigide, qui fit fermez les yeux à chaque constatation de variabilité.

Ce ne fut certainement pas un mal, qu'une telle opinion eût dirigé par sa rigidité, le premier demi-siècle de la bactériologie.

L'étude de la « variabilité » possède un caractère nettement analytico-critique qui pour être fructueux devait succéder à la théorie rigoureusement systèmatique de la constance des espèces. Cette théorié guidée par les principes classiques de Koch, contribua fort bien à augmenter nos connaissances dans le champ de la bactériologie. Si dès cette première période de formation de la bactériologie, l'hypothèse de la variabilité s'était affirmée, on en peut déduire, que celle-ci, en modifiant ses bases, aurait pu compromettre gravement les résultats obtenus, et qui ont été vraiment précieux pour les applications modernes de la medecine préventive et curative.

Le dogme que les bactéries de chaque espèce possèdent toujours et uniquement un certain nombre de caractères et de propriétés, qui a été accepté par la plupart des auteurs comme un acte de foi, a incité chacun à ne pas se perdre dans la recherche des éléments dissemblables.

Les mêmes méthodes sélectives d'isolement se « standardisèrent » avec l'emploi commode des boites de Pétri, et même dans les laboratoires les plus renommés on pratiqua les ensemencements dans des pièces ordi-

naires, avec la certitude que toute contamination de l'air aurait pu être reconnue par les caractères mêmes de la colonie.

Tout cela nous a amené à une technique simple qui a produit de grands résultats, joints à une grande économie d'éffort mental dans la recherche, comme dans l'enseignement. Mais après avoir cueilli le long de ces chemins, tout ce que l'on pouvait obtenir, on y rencontrait depuis quelque temps des difficultés.

L'étude du phénomène des variations et des dissociations bactériennes, qui jusqu'à il y a quelqeus années, était acueilli avec méfiance, et par quelques auteurs même avec mépris, a attiré maintenent l'attention générale. Le nombre des recherches toujours plus grand est vraiment exceptionnel: on compte déjà des milliers de publications.

Cette documentation croissante est le témoignage que la semence jetée par les précurseurs a germé et qu'elle se reproduit en reconnaissance concordante des mérites de ces précurseurs.

En éloignant la suggestion facile des résultats les plus transformistes, pour nous arrêter à ceux plus largement vérifiés, nous avons vu que ce n'est pas l'hypothèse d'un pléomorphisme d'après Naegeli, ni d'après Vincentini-Tissot, qui est de nouvau confirmée aujourd'hui. C'est l'existence même de phénomènes de variabilité dans les caractères des espèces bactériennes qui est démontrée pour tous. La limite d'action de ce mouvement varie avec les chercheurs qui y adhèrent. L'apparition temporaire ou durable d'atypies dans les unités cellulaires, ainsi que dans les colonies, dans les propriétés biologiques ainsi que dans le propriétés antigèniques, sous l'action de stimulants bien determinés, est cependant universellement reconnue.

D'après Gotschlich, les germes pathogènes doivent être considérés comme phylogénétiquement dérivés des formes saprophytiques analogues et, pour cela même, la spécificité doit être jugée non pas comme une chose immuable, mais certainement comme un produit de la variabilité. Mais même si cette proposition était appuyée par le consentement unanime, son importance resterait purement dans le champ spéculatif des théories puisque nous n'avons aucune preuve sérieuse pour supposer « la variation » comme un phénomène débutant soudainement en une capricieuse et facile transformation de saprophytes en parasites ou viceversa.

Le variations ne se forment, certainement, pas sans une règle. Il est plus sage de démontrer que, si une partie du phénomène et imputable à des conditions intrinsèques, relevant de la bactérie même (phase critique, par exemple), la partie fondamentale est dûe au « climat externe », c'est à dire au milieu. Il est présumable que par des recherches ultérieures et plus systématiques on pourra arriver, mieux qu'aujourd'hui, à démontrer

l'ordre dans la progression des phénomènes dissociatifs de chaque espèce, sous l'influence de facteurs stimulants déterminés. L'innovation apportée par les études que nous sommes en train de traiter, consiste en ce que l'on doit ajouter aux caractères morphologiques, culturaux, biologiques, antigèniques et pathogèniques du type fondamental d'une espèce, tous ces types secondairer que l'on a pu découvrir par l'étude de toutes les variantes possibles de celui-ci, et pur la recherche des leurs affinités avec des espèces bien distinctes

C'est là le cas du rapprochement des B. paratyphiques A et B (Scott-müller) qui sont les agents d'une maladie typhique particulière chez l'homme, avec les B. paratyphiques C (types Newport, Oranienburg, ecc.) et avec les B. enteritidis Breslau et Gärtner, qui sont d'abord des agents d'épidémies chez les animaux tandis que chez l'homme ils donnent un tableau morbide se rapprochunt davantage des formes dysentériques.

Nous voyons que de nouveaux types ont encore été identifiés parmi les B. de la pseudo-dysentérie (B. Schmitz, B. dys. E., etc.).

Les Br. melitensis, abortus, suis et paramélitensis, ont été rapprochés par des liens plus stricts.

Même pour ce qui regarde la stabilité des types humains et bovins de la tuberculose, la vérification continuelle de types intermédiaires, rend toujours plus démonstrative l'existence de phénomènes de variation chez un type et chez l'autre.

Dans le grand groupe des pneumocoques, l'analyse du type IV, sans uniformité, et avec une forte tendance aux variations, a permis l'individualisation de sous-types qui réalisent un meilleur contact entre les trois premiers types bien définis. Selon Rosenow (de Rochester), Morgenroth et ses collaborateurs, tous les pneumocoques et tous les streptocoques devraient être réunis dans une espèce unique bien distincte.

Le gonocoque possède aujourd'hui, à coté du type principal, trois autres types secondaires. Chez les méningocoques, la subdivision des types n'est pas encore établie suivant une manière unanimement adoptée: selon Eastwood, Griffith, Scott, etc., les types seraient au nombre de 2; selon Gordon, Tulloch, Nicolle, Deboinis, Jouan, ils seraient au nombre de 4; en outre, il y a beaucoup de groupes (analogues au type IV des pneumocoques) qui sont dénommés paraméningocoques par Dopter.

Pour le typhus aussi, on a distingué deux types suivant leur mode d'action sur le xylose. Même pour des espèces bactériennes classées parmi les plus constantes et la mieux définies, telles que le V. du choléra et le B. anthracis, les rapports de parenté, respectivement, avec les V. pseudo-choléra et avec les B. anthracoïdes, vont trouver des élements objectifs de démonstration, dans la coïncidence des caractères de ceux-ci avec d'autres caractères de souches dissociées des premiers.

Il est hors de doute que par l'étude de dissociations, on puisse révéler un plus grand nombre d'affinités entre les différents types de bactéries et qu'on puisse trouver des conjonctions très importances au point de vue théorique et même, au point de vue épidémiologique, entre des types et des espèces qu'on avait d'abord jugés distincts, ou laissés dans des groupes non unifiés.

Dans des conditions déterminées, on a pu obtenir la variation d'un Bacille pathogène en un Bacille apathogène, et il paraît qu'on soit atrivé même plus loin, ayant pu aussi transformer une bactérie d'une espèce apathogène définie en un type d'une espèce pathogène voisine. Aucune démonstration sérieuse n'a été donnée de la transformation d'une espèce en une autre de type éloigné; mais de tout l'ensemble des faits, il apparaît manifeste qu'à la signification statique, donnée par Koch et Cuvier, aux espèces bactériennes, on substitue peu à peu une autre signification essentiellement dynamique.

D'après Bail et Natoneck, auxquels s'associent Braun Gotschlich et d'autres, l'ampleur de la variation appartient aux caractéristiques même de l'espèce.

Ayant établi que les caractères d'un germe déterminé peuvent varier sous la poussée d'influences externes, nous trouvons ainsi la raison de la constance de ces caractères (que chaque espèce bactérienne en particulier possède par nature). En effet pour le retour fréquent de celles-ci vers des caractéres constants, dans un milieu naturel pour lequel elles ont une sensibilité biologique, la règle de leur retour à ces fonctions est guidée et stimulée par le milieu lui même. Le milieu constitue donc un ensemble complexe de conditions auxquelles, la bactérie doit s'adapter à travers des « variantes en plus ou en moins ». A la modification du milieu vital d'une bactérie ne peut faire suite que la disparition ou la variation des caractères de celle-ci.

Pour le virus pathogène, on peut penser que l'organisme de l'animal sensible, soit justement le milieu propre à la conservation de ses caractères, ou à leur retour, s'il s'agissait d'une souche variée. Par opposition, l'organisme d'individus convalescents ou naturellement immuns, en s'opposant à son activité et en l'obligeant ainsi à une vie saprophytique, exciterait aussi le germe à des phéonmènes de variations.

En effet, de nombreuses expériences, nous prouvent que l'organisme réceptif à le pouvoir de stimuler des phénomènes régressifs chez des souches variées, et non pas de stimuler des variations de souches pathogènes pour lequelles il est réceptif. Moins nombreuses sont les faits déjà acquis sur l'existence, ou mieux sur les modalités d'apparition, chez des individus guéris de variantes, d'après Arkwright.

Sur ce point si intéressant, manque encore l'apport de recherches

systèmatiques. On doit pourtant bien observer, combien les probabilités de pouvoir étudier ce phénomène, avec bien peu d'éléments de base sur les variations' sont précaires.

En effet, en dépit des difficultés que cela représente pour le chercheur c'est bien peu de chose pour en tirer une conclusion, que la vérification des caractères de ces colonies dérivées, choisies parmi tant d'autres comme les plus aptes à mieux représenter le phénomène de la variation.

Il est bien évident que pour pouvoir arriver à la conclusion d'un tel problème, on devrait analyser les caractères d'un certain nombre, de souches provenant de colonies isolées dans les meilleures conditions au moment même de la guérison, « à la stérilisation » d'un malade et sur une série de malades, au moment de la décroissance de l'épidémie. Cela demande un personnel expérimenté et nombreux, une « chambree particulière, pour l'isolement », où l'asepsie puisse être garantie d'une manière, absolue, et beaucoup d'autres moyens. Cependant nous avons des expériences qui prouvent que des germes isolés de convalescents et de porteurs de germes, par exemple, accusent une dégradation plus ou plus ou moins accentuée: dans les fèces des dysentériques apparaissent les formes variées R: chez les convalescents de pneumonie causée par le type I et II, l'on trouve souvent le type IV, qui est constitué par des sous-types moins virulents: chez les convalescents de diphtérie on trouve souvent le B. pseudo-diphtérique; pour le V. du choléra on a beaucoup discuté sur la signification de quelques souches déviées de la souche du normale et trouvées chez les porteurs (V. El Tor.); pour les méningocoques, on admet des oscillations soudaines de la virulence, à apparence spontanée.

Par ces connaissances et par d'autres, qui demandent assurément, des études ultérieures, pour étayer des hypothèses bien solides, on peut cependant soupçonner comme un fait très vraisemblable, que les bactéries pathogènes dans la succession des générations, présentent en rêgle générale une modification périodique de quelques caractères; vis-à-vis des éventualités naturelles, ces variations dévraient être considérées comme des faits cycliques normaux.

Une telle conception pourait nous éclairer dans la compréhension des cycles infectieux et épidémiques, un peu mieux que l'unique connaissance de l'agent infectieux, conçu dans ses seuls caractères rigoureux.

Dresel et Stickl (261) ont rapporté avoir isolé de l'homme des bacilles typhiques atypiques, qui étaient tout à fait semblables à d'autres phénotypes réversibles, dissociés auparavant « in vitro » par Stickel (262), d'un type Eberth-Gaffky.

Or, un telle démonstration est importante parce qu'elle peut nous faire comprendre quelques faits épidémiologiques qui n'étaient pas bien clairs jusqu'à aujourd'hui. Elle peut nous expliquer, par exemple, pourquoi

les recherches du B. d'Eberth-Gaffky dans l'eau qui pouvait causer une épidémie de typhoïde, sont négatives. Ces bacilles, en trouvant dans l'eau une excitation aux phénomènes de variabilité, modifient quelques uns de leurs caractères antigèniques et fermentatifs par lesquels nous avons l'habitude de les identifier au laboratoire; mais à peine sont-ils ingérés par l'homme sensible, qu'ils trouvent une excitation à la réversion, en redevenant des bacilles typiques de la typhoïde.

Même l'immunologie et le diagnostic bactériologique peuvent tirer d'utiles conseils des connaissances dérivant de ces études sur la variabilité.

En substituant à l'hypothèse des espèces bactériennes constantes (comprises commes les résultantes de formes bactériennes à caractères statiques, dans n'importe quelles conditions de milieu qui pourraient les tuer, mais non pas les faire varier) celle, d'espèces bactériennes dynamiques, on doit admettre que dans celles-ci, coexistent, avec des formes ayant tous les caractères du type fondamental, des formes, en évolution continuelle, progressive ou régressive, dans des directions déterminées et dans certaines limites, et des formes variées, plus ou moins nombreuses, plus ou moins stables et qui peuvent constituer chez l'espèce, des types plus ou moins importants, unitaires ou non fixés.

Par une telle conception de l'espèce, il s'ensuit qu'un vaccin anti-espèce, ne peut plus être constitué par une souche unique, ni par plusieurs souches choisies au hasard, mais de toute une gamme des types représentés dans l'espèce, en fonction de l'importance antigènique de chacun d'eux.

Pour quelques infections, comme pour celles par pneumocoques, surtout pour la production de sérums-curatifs espèce ou typo-spécifiques, il est indispensable de disposer en dehors des trois types bien définis, d'une gamme considérable des souches non unitaires, représentées avec lé plus de fréquence dans la région.

Il en est de même soit à l'égard des dysentéries, soit des infections à streptocoques ou méningocoques, etc.

Sous le point de vue des particularités morphologiques, on connaît aujourd'hui, par exemple, la grande importance que possède la capsule dans la valeur antigènique et le type des pneumocoques; on sait que pour les vaccins prophylactiques dans le groupe des germes intestinaux on doit employer les formes S et non pas les formes R

Les connaissances actuelles sur les antigènes H et O permettent des déductions moins faciles. Arkwhricht croit que c'est particulièrement l'antigène somatique O qui a de l'importance en pathologie.

Par l'emploi de formes antigènes H (thermolabile-flagellaire) et O (thermostabile-somatique) on est, au contraire, parvenu, à produire chez

les lapins, des sérums servant au diagnostic, d'une valeur particulière pour ces études sur les variations bactériennes. Par des essais d'agglutination, d'absorption et d'agglutination croisée, on a pu reconnaître que l'antigène thermostable des formes R possède une large polyvalence, d'où en est venu le nom d'« antigène cosmopolite », et l'on a pu établir des rapprochements entre des espèces que l'on croyait complètement distinctes, telles que la souche Stanley et le B. Eberth, le B. paratyphique A et la souche Sendai dans les Salmonella, le B. mallei et B. Whitimori, le B. tularensis et le B. melitensis.

Ces nouvelles acquisitions si elles apportent certainement des éléments précieux pour faire mieux comprendre les phénomènes d'évolution chez les bactéries, représentent aussi un progrès concret, au chapitre du diagnostic bactériologique, pour quiconque l'envisage sous son véritable criterium.

En pratique, les souches servant au diagnostie ne doivent pas être prises parmi des formes pures S. R. H. O., mais parmi des formes mixtes. Des recherches plus nombreuses et plus systématiques, sont nécessires afin de pouvoir définir la formule de ces souches specialisées pour le diagnostic suivant les espèces. Cependant nous savons déjà que les formes R sont contrindiquées, à cause de leur agglutinabilité et que les formes H, extrêmement sélectionnées, peuvent amener à des types qui sortent de l'espèce (Andrew) comprise dans ses limites pratiques actuelles.

Il paraît assuré que les souches, où prévaut l'antigène O qui renferme aussi la fraction capsulaire, sont celles qui présentent la meilleure receptivité pour les anticorps élaborés pendant les processus morbides de la fièvre entérique et du typhus exanthématique (Weil, Felix, Olikski, Pijper, ecc.).

Mais il faut reconnaître que les caractères attribués aux formes S. H et O, surtout maintenant que l'on a ajouté à ces deux derniers la conception de l'élément flagellaire et somatique, de l'élément thermolabile et thermorésistant, ne sont pas faciles à retrouver dans chaque espèce bactérienne en particulier, sans donner lieu à confusion.

La forme S de Arkwright, dans beaucoup de cas peut coïncider, aussi bien avec la forme H qu'avec la forme O de Weil et Felix De même, si en suivant Arkwright nous appelons flagellaires les formes H, puisqu'on peut trouver l'antigène flagellaire même dans les formes H, la confusion augmente. Dans des recherches faites dans notre laboratoire de Sienne, par la méthode de la coloration des cils, on a pu voir que le Proteus X^{19}, est pourvu de flagelle même dans les formes O.

Il faut donc attendre l'apport de contributions ultérieures qui pouront mieux nous éclaires sur ce point.

En excluant les formes R dans le choix de souches destinées aux

diagnostics, nous nous préoccuperons d'avoir, outre une souche possédant les caractères du type fondamental, une autre ou même plusieurs représentant l'ampleur de la variabilité.

Le contrôle des caractères de chaque souche s'impose donc; celle ci doit être défendue, par de meilleurs soins que ceux ordinairement en usage, des influences agissant sur les phénomènes dissociatifs (lumière, air, vieillissement, pH, type du milieu).

Tout cela n'apporte pas de complications préoccupantes, puisqu'il ne s'agit que de continuer sur un chemin déjà entrepris.

Pour ces formes d'infection où le diagnostic de laboratoire se base sur les séro-diagnostics (germes intestinaux et brucella), on devra prendre soin d'amplifier la collection des souches de diagnose sérologique avec tous les types concourrant à former l'espèce et particulièrement avec les plus fréquents dans la région.

Dans les maladies infectieuses à pneumocoques à meningocoques et à gonocoques, si aux utilisations thérapeutiques, on décide de joindre la pratique du diagnostic sérologique de type, il serait nécessaire en dehors des isolements en culture de disposer de sérums specifiques types d'espèces produits par un Institut Central.

Pour les autres agents infectieux enfin (influenza, septicemies, tuberculose, etc.) on devrait suivre systématiquement une pratique mieux basée sur les méthodes électives d'isolement et sur les recherches de verification microscopique, culturale, biologico-antigènique, des caractères appartenants à « l'espèce » (comprise comme résultante de l'ampleur même de sa variabilité).

BIBLIOGRAPHIE.

(1) *Cohn*, Beiträge zur Biologie der Pflanzen, Bd. 1, 1875.
(2) *Naegeli*, « Die niederen Pilze », München 1877; « Unters über niedere Pilze », 1882.
(3) *Buchner*, « Ueber d. exp. Erzeugung d. Milzbrandcont. a. d. Heupilzen », München 1883.
(4) *Zopf*, « Zur Morphologie der Spaltpflanzen », Leipzig 1882; « Zur Morphologie u. Biologie der niederen Pilzthiere (Monadinen) », Leipzig 1885.
(5) *Flügge*, « Les microorganismes ». Trad. dalla 2a ed., A. Monceaux, Bruxelles 1887.
(6) *Van Thieghem*, Comp. Rend. Soc. Biol., 1879.
(7) *Zopf* e *Miller*, Arch. f. exp. Path. u. Pharm, 1882.
(8) *Piccioli*, Rif. Medica, 1926, pag. 712; Boll. Soc. Int. di Microb., III, 1931, pag. 27.
(9) *Belfanti*, Arch. per le Scienze Mediche, 1892.
(10) *Vernoni*, Il Policlinico, sez. medica, 1922.
(11) *Sanarelli*, Ann. d'Igiene, 1927, pag. 569.
(12) *Favilli*, Lo Sperimentale, LXXXIII, V, 1929.
(13) *Morelli Elisa*, Boll. dell'I. S. Mil., 1930, pag. 367.
(1) *Lehmann* e *Neumann*, «'Atlas und Grundriss der Bakteriologie », 1896.
(15) *Sanarelli*, Ann. de l'Inst. Pasteur, 1893.
(16) *Firtsch*, Arch. f. Hyg, 8, 1888, pag. 369.
(17) *Gasperini*, Soc. toscana di scienze nat., 1895.
(18) *Nocard*, Ann. Ist. Pasteur, 1898, pag. 561.
(19) *Bang*, Ztbl. f. Bakt., 46, 1908, pag. 461.
(20) *Ferran*, Congr. Inter. de la Tuberc., Paris 1905, pag. 170.

(21) *Concetti*, Ann. d'Ig. Sper., 1901, pag. 204.
(22) *Martoglio*, Ann. d'Ig. Sper., 1899.
(23) *Valenti*, Ann. d'Ig. Sper., 1900, pag. 449.
(2) *Casagrandi*, Ann. d'Ig. Sper., 1901, pag. 163; 1903, pag. 456.
(25) *Sobernheim* e *Seligmann*, Zentr. f. Pakt. Ref., 50, 1911, pag. 134.
(26) *Schnitzer* e *Munter*, Eeit. f. Hyg., Bd. 93-94-99; Münch. Med. Woch., 27, 1923.
(27) *Bernhardt*, Zeit. f. Hyg., 79, 1915, pag. 179.
(28) *Schmitz*, Zentr. f. Bakt. O., Bd. 77, 1917, pag. 369.
(29) *Müller R.*, Zentr. f. Bakt. O., Bd. 58, 1911.
(30) *Schmitz*, Zeith. f. Hyg., 74, 1917, pag. 449; Zentr. f. Bakt. O., Bd. 83, 1919, pagine 210.
(31) *Zironi*, Ann. d'Igiene, 1919, pag. 493.
(32) *Zironi*, Boll. dell'Ist. S. Mil., 1920.
(33) *Sanfelice*, Ann. d'Igiene, 1920-1921; Boll. dell'I. S. Mil., 1920-1921-1924-1925.
(34) *Capone*, Lo Sperimentale, LXXIII, 1919, pag. 385.
(35) *Scarpellini*, Boll. dell'I. S. Mil., 1924, pag. 85.
(36) *Lusena*, Lo Sperimentale, 1926-IV.
(37) *Boncinelli*, Lo Sperimentale, LXXXIV, 2-3, 1930.
(38) *Gerbasi*, Arch. di Pat. e Clin. pediatrica, 1925, n. 1.
(39) *Marrassini*, Lo Sperimentale, LXXIII, 1919, pag. 193.
(40) *Ascoli Alberto*, Ig. Moderna, 1921, pag. 1.
(41) *Favilli*, Lo Sperimentale, 1925, fasc. VI; 1926, fasc. IV; Minerva Medica, 1926. n. 28; Boll. dell'Ist. S. Mil., 1927, pag. 341.
(42) *Boncinelli*, Boll. dell'I. S. Mil., 1927, pag. 377.
(43) *De Antoni*, Boll. dell'I. S. Mil., 1929, pag. 787.
(44) *Alessandrini* e *Sabatucci*, Ann. d'Igiene, 1931, pag. 29.
(45) *Pampana*, Ann. d'Igiene, 1931, pag. 537.
(46) *Neisser*, Zentr. f. Bakt. R., 38, 1906, pag. 98.
(47) *Massini*, Arch. f. Hyg., Bd. 61, pag. 250.
(48) *Kowalenko*, Zeit. f. Hyg., Bd. 66, pag. 277.
(49) *Eisemberg*, Zentr. f. Bakt. O., 1906-1912-1914-1918-1919.
(50) *Penfold*, Brit. Jour. of. Hyg., 11, 1910, pag. 30; Id. 11, 1912, pag. 478; Id. 12, 1912, pag. 195; Brit. Med. Jour. 2, 1910, pag. 1671; Proc. Roy. Soc. Med. Path. Sect., 1911, pag. 97.
(51) *Ledingham*, Brit. Jour. Hyg., 7, 1918, pag. 409.
(52) *Weil* e *Felix*, Wien. Klin. Woch., 1917, 30, pag. 1509.
(53) *Baerthlein*, Zentr. f. Bakt. O., Bd. 81, 1918, pag. 369.
(54) *Arkwright*, Jour. Path. Bact., 24, 1921, pag. 36.
(55) *Gorini*, Rend. R. Accad. Lincei, 11, 1902, pag. 159; R. Ist. Lombardo Sc. e Lett., 54, 1921, pag. 295; Id. 64, 1931, fasc. VI-X; Gior. di Batt. e Imm., 1928, n. 9, pag. 593; Id. 1930, pag. 1141; Jour. of. Bact., 23, 1932, pag. 27.
(57) *Arkwright* e *Goyle*, Brit. Jour. exp. Path. ,1924, 5, pag. 104.
(57) *Schandinn*, Arch. f. Protist., 1902-1903.
(58) *Dobell*, Quart. Jour. Microb. Sc., 52, 1902, pag. 121.
(59) *Stewart*, Jour. of. Hyg., 1928, pag. 379.
(60) *Ilvento*, Zentr. f. Bakt. O., 61, 1911, pag. 344.
(61) *Neri*, Ig. Moderna, 1912, pag. 261.
(62) *Izar*, Pathologica, 1-6-1916.
(63) *Izar*, Rif. Medica, Maggio 1926, n. 19.
(64) *Bogetti*, Boll. dell'I. S. M., 1931, n. 6.
(65) *Sabatucci*, Boll. Sez. It. loc. Int. Microb., 1931, pag. 175.
(66) *Seppilli* e *Guiso*, Riv. di Biologia, XIV, f. I, II, 1932.
(67) *Seppilli* e *Denes*, Diag. e Tecn. di Labor., n. 2, 1932; Boll. dell'I. S. Mil., 1932, fasc. VI.
(68) *Cilli*, Boll. dell'I. S. Mil., 1932, pag. 359.
(69) *Spinelli*, Ann. d'Igiene, 1932.
(70) *Uhlenhuth* e *Zuelzer*, Zentr. f. Bakt., O. 85, 1921.
(71) *Beijerink*, Folia, Microb., 1912, 1, pag. 4.
(72) *Daddi*, Com. in questo Congresso.
(73) *Toenniessen*, Zentr. f. Hyg., 73, 1914.
(74) *Mülhens* e *Raven*, Zeit. f. Hyg., 55, 1906.
(75) *Schnitzer* e *Munter*, Zeit. f. Hyg., 99 1923, pag. 366.
(76) *Pulvermacher*, Zeit. f. Hyg., 97, 1922, pag. 89.

(77) *Braun* e *Salomon*, Zentr. f. Bakt O., 82, 1918, pag. 243.
(78) *Bertarelli*, Zentr. f. Bakt. O., 34, 1903, pag. 193.
(79) *Jollos*, Zentr. f. Bakt. O., 103, 1924.
(80) *V. Loghem.*, Zeit. f. Hyg., 110, 1929.
(81) *Schottelius*, Festschrift für Kölliker, Leipzig, 1887.
(82) *Wasserzug*, Ann. de l'Inst. Pasteur, 2, 1888.
(83) *Almquist*, Zeit. f. Hyg., 83, 1916, pag. 1.
(84) *Vernoni* e *Fichera*, Soc. It. Biol. Sper., III, 8, 1928.
(85) *Fuhrmann* e *Orth*, Proc. Roy. Soc. London, 89, 1917.
(86) *Löhnis*, Nat. Acad. of. Sc. Mem., 16, 1922.
(87) *Enderlein*, « Bakterien Ziklogenie », 1925, Berlin-Leipzig.
(88) *Mellon*, « Studies in microbic. heredity », 1925-1926.
(89) *Laurent*, Ann. de l'Inst. Pasteur, 4, 1890, pag. 465.
(90) *Bail*, Zentr. f. Bakt. O., 75-76, 1914.
(91) *Preisz*, Zentr. f. Bakt. O., 35, 1904; 47, 1907; 78, 1911.
(92) *Bail* e *Flaumenhaft*, Zentr. f. Bakt. O., 79, 1917, pag. 425.
(93) *Katzu*, Zentr. f. Bakt. O., 96, 1925, pag. 281.
(94) *Roux* e *Yersin*, Ann. Inst. Pasteur, 1890, pag. 385.
(95) *Hewlett* e *Knight*, Trans. Brit. Inst. Prav. Med., 1897, pag. 7.
(96) *Hirschfeld* e *Zajdel*, C. R. Soc. Biol., 90, 1924, pag. 1104.
(97) *Yoshioka*, Zeit. f. Hyg., 97, 1923, pag. 232.
(98) *Reddish*, Jour. Inf. Dis., 1927, v. 40.
(99) *Soule*, Jour. of. Bact., 1932, pag. 30.
(100) *Zlatogoroff*, Congr. Int. Micr., Parigi 1930, T. I.
(101) *Morishima*, Jour. of. Bact., 1921, 6, pag. 275.
(101) *Vaudremer*, C. R. Soc. Biol., 1921, pag. 251 e pag. 1055.
(103) *Wreschner*, Zeit. f. Hyg., 93, 1921, pag. 74.
(104) *Henri*, C. R. Acad. Sc., 1914, pag. 413.
Henri e *M.me Henri*, C. R. Acad. Sc., 1914, pag. 413.
(104*) *Toda Tadao*, Zeit f. Hyg. 112, 1932, pag. 463.
(105) *Petragnani*, Atti di questo Congresso.
(106) *Guignard* e *Charron*, Jour. de Méd., 2, 1888.
(107) *Chamberland* e *Roux*, C. R. Acad. Sc., 1883, pag. 96.
(108) *Malvoz*, Ann. Inst. Past., 11, 1897, pag. 582.
(109) *Villinger*, Arch. f. Hyg., 1894, pag. 101.
(110) *White*, Med. Res. Counc., 91, 1925; 103, 1926.
(111) *Goyle*, Jous. Path. Bact., 1926, pag. 149.
(112) *Braun* e *Schaeffer*, Zeit. f. Hyg., 89, 1919, pag. 339.
(113) *Lommel*, Comp. R. Soc. Biol., 95, 1926, pag. 711 e pag. 714.
(114) *Roger*, C. R. de l'acad., T. 117, 1893.
(115) *Pinna*, Baumgarteu Johr., 1893.
(116) *Revici*, C. R. Soc. Biol., 87, 1922.
(117) *Mazzetti*, Com. alla R. Accad. dei Fisiocritici in Siena, 26 Giugno 1928.
(118) *Möhler* e *Washburn*, cit. da *Gurney* e *Dixon*: « The trasmutation of Bacteria ».
(119) *Burnet F. M.*, Brit. Jour. exp. Path., 1924, 5, pag. 251.
(120) *Wolf*, Zeit. f. Abstämmungs, 2, 1909, pag. 90.
(121) *Matzuschita*, Zeit. f. Hyg., 35, 1900, pag. 495.
(122) *Hoffstadt* e *Youmans*, Jour. of. Bact., 1932, 1, pag. 34.
(123) *Mallmann* e *Gallo*, Jour. of. Bact., 1932, 1, pag. 33.
(124) *Löffler*, Zentr. f. Bakt. O., 38, 1906, pag. 101.
(125) *Revis*, Proc. Roy. Soc., 86, 1913, pag. 373.
(126) *Pierguidi*, Igiene Moderna, 1930, n. 3.
(127) *Feiler*, Zeit. f. Immun., 29, 1920, pag. 303.
(128) *Vanni*, Atti di questo Congresso.
(129) *Buonomini*, Atti di questo Congresso.
(130) *Gildemeister*, Zent. f. Bakt. O., 78, 1916, pag. 129.
(131) *Rosenthal*, C. R. Soc. Biol., 95, 1926, pag. 445.
(132) *Emmerich* e *Low*, Zeit. f. Hyg., 31, 1899, pag. 1.
(133) *Malfitano*, C. R. Acad. Med., 1900, 2, pag. 295.
(134) *Reed*, Jour. of. Bact., 1932, n. 1.
(135) *Isabolinski*, in « Les associations microbienne » di *Papacostas* e *Gaté*. Bailliére ed., Paris.
(136) *Vaudremer*, C. R. Soc. Biol., 74, 1913, pagg. 278 e 752.

(137) *Metchnikoff*, Ann. Inst. Pasteur, 1889, pag. 61.
(138) *Karlinski*, Zentr. f. Bakt., 1889, pag. 193.
(139) *Soule*, Journ. of. Inf. Dis., 42, 1928, pag. 93.
(140) *Eisler* e *Silberstern*, Zeit. f. Hyg., 1921, pag. 267.
(141) *Jordan*, Jour. Ann. Med. Ass., 86, 1926, pag. 177; Proc. Soc. Exp. Biol. e Med., 23, 1926, pag. 7.2.
(142) *Mazzetti*, Com. alla R. Accad. dei Fisiocritici, Giugno 1932.
(143) *Twort*, Proc. Roy. Soc. 19, 1907, pag. 329.
(144) *Müller R.*, Zent. f. Bakt., 42, 1908, pag. 57; Münch, Med. Woch., 56, 1909, pagina 885.
(145) *Lombardo-Pellegrino*, Ann. d'Igiene, 14, 1904.
(146) *Manfredi*, Atti R. Accad. Lincei, 1887.
(147) *De Kruif*, Jour. Exp. Med., 33, 1921, pag. 775; 35, 1922, pag. 561 e pag. 621; 36, 1922, pag. 309.
(148) *Wilson*, Jour. Path. and Bact., 11, 1906, pag. 394.
(149) *Jacobsen*, Zentr. f. Bakt. O., 66, 1910, pag. 208.
(150) *Pancalos*, C. R. Soc. Biol., 97, 1927, pag. 239.
(151) *Etinger-Tulczynska*, Zent. f. Bakt. O., 110, 1929, pag. 589.
(152) *Bohdonowicz* e *Lawrynowicz*, Zentr. f. Bakr. O., 1932.
(153) *Casagrandi*, Ann. d'Ig. Sper., 1900, pag. 431.
(154) *Kodama*, Zeit. f. Bakt. O., 62, 1912.
(155) *Reimann*, Jour. Exp. Med., 41, 1925, pag. 587; 43, 1926, pag. 107.
(156) *Amon*, Jour. Exp. Med., 41, 1925, pag. 649.
(157) *Nungester*, Jour. Inf. Dis., 44, 1929, pag. 73.
(158) *Kolle*, *Sclossberger*, *Pfaunestill*, citati da *Sanfelice*.
(159) *Morton C. Kahn*, Jour. of. Bact., 1932, n. 1.
(160) *Sacquépée*, Ann. Inst. Pasteur, 15, 1901, pag. 249.
(161) *Cowan*, Brit. Jour. Exp. Path., 3, 1922, pag. 187; 4, 1923, pag. 241; 5, 1924, pag. 226.
(162) *Behring* e *Nissen*, Zeit. f. Hyg., 8, 1900, pag. 412.
(163) *Hess*, Arch. f. Hyg., 89, 1921.
(164) *Eagles*, Brit. Jour. Exp. Path., 9, 1928, pag. 330.
(165) *Paulson* e *Brown*, Jour. of Bact., 1932, n. 1.
(166) *Enden*, Jour. of. Bact., 1932, n. 1.
(167) *Metchnikoff*, Ann. Inst. Pasteur, 1, 1887, pag. 42.
(168) *Ramson* e *Kitashima*, Deut. Med. Woch., 19, 1897, pag. 295.
(169) *Hamburger*, Wien. Klin. Woch., 4, 1903, pag. 497.
(170) *Nicolle*, C. R. Soc. Biol., 50, 1898, pag. 1054.
(171) *Steinhardt*, Jour. Med. Res., 13, 1904, pag. 409.
(172) *Zinnser*, Infection and Resistance, 1920.
(173) *Andriani*, Arch. Sc. Biol., V, 1-2, 1923.
(174) *Griffith*, Rep. on Pub. Health and Med. Sub., Min. of Healt, n. 18, 1923; Jour. of. Hyg., 27, 1928, pag. 113.
(175) *Baerthlein*, Arb. a d. Kair. Ges. amte, 40, 1912, pag. 433; Zentr. f. Bakt. Ref. 1912, Beilage, pag. 178.
(176) *Bail* e *Flaumenhaft*, Zentr. f. Bakt, 79, 1917, pag. 1509.
(177) *Balteanu*, Jour. Path. Bact., 29, 1926, pag. 251.
(178) *Zdrodowsky*, *Breen*, *Voskressenski*, Ann. Inst. Past., II, 1930, pag. 768.
(179) *Todd*, Brit. Jour. Exp. Med., 9, 1928, pag. 1.
(180) *Julianelle*, Jours. Exp. Med., 44, 1926, pag. 685 e 735.
(181) *Atkin*, Jour. Exp. Med., 4, 1923, pag. 825; 6, 1925, pag. 325.
(182) *Crowell*, Journ. of. Bact., 11, 1926, pag. 65.
(183) *Kun* e *Fenyvessy*, Zentr. f. Bakt., 124, 1932, pag. 485.
(184) *Petroff*, *Branch*, *Steenken*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 25, 1927, pag. 14.
(185) *Wagner*, Zentr. f. Bakt., 83, 1920, 386.
(186) *Bordet J.* e *Sleewyk*, Ann. Inst. Past., 24, 1910, pag. 476.
(187) *Begbie*, R. S. Edimburgh. Med., Jour., 38, 1931, pag. 174.
(188) *Pugnani*, Gior. di Batt. e Imm., marzo 1932.
(189) *Müller*, Ann. d'Igiene, giugno 1932.
(190) *Andrewes*, Jour. Path. a Bact., 25, 1922, pag. 505; 28, 1925, pag. 345.
(191) *Schockaert*, C. R. Soc. Biol., 81, 1929.
(192) *Enderlein*, « Grundelemente der vergleichende Mörphologie u. Biol. des Bakt. (Bakt Studien III). Sitzungsber Ges. Natur. Freunde ». Berlin, 1916, pag. 403.

([193]) *Pico*, C. R. Soc. Biol., 87, 1922, pag. 836.
([194]) *Monteiro*, C. R. Soc. Biol., 93, 1925.
([195]) *Pesch*, Zentr. f. Bakt, 93, 1925, pag. 525.
([196]) *V. Darany*, Zentr. f. Bakt., 102, 1927.
([197]) *Sonnenschein*, Zentr. f. Bakt., 95, 1925, pag. 257.
([198]) *Arkwright*, Brit. Jour. Exp. Path., 5, 1924, pag. 23; Jour. Path. a. Bact., 5, 1924, pag. 114; 29, 1926, pag. 318; 30, 1927, pag. 345 e 566; The Lancet. 1927, pag. 13; 1929, pag. 963.
([199]) *Topley* e *Ayrton*, Jour. of. Hyg., 22, 1924, pag. 223.
([200]) *Orcutt*, Jour. Exp. Med., 38, 1923, pag. 9; 40, 1924, pag. 627.
([201]) *Gratia*, C. R. Soc. Biol., 84, 1921; 89, 1923.
([202]) *Neufeld* e *Lewinthal*, Zeit. f. Immun., 55, 1928, pag. 324.
([203]) *Dawson, Martin, Avery, Osvald*, Proc. Soc. f. Exp. Biol. Med., 24, 1927, pag. 943.
([204]) *Dawson* e *Martin*, Jour. Exp. Med., 47, 1928, pag. 547.
([205]) *John*, Jour. Exp. Med., 36, 1927, pag. 763 e 807.
([206]) *Petroff, Branch, Steenken*, Ann. Rev. Trib., 19, 1929, pag. 9.
([207]) *Petroff* e *Steenchen*, Jour. Exp. Med., 51, 1930, pag. 831.
([208]) *Petroff*, Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 24, 1927.
([209]) *Kraus*, Zeit. f. Immun., 61, 1929, pag. 454.
([210]) *Uhlenhuth* e *Seiffert*, Zeit. f. Immun., 69, 1930, pag. 187.
([211]) *Hutyra*, Zeit. f. Immun., 62, 1921, pag. 74.
([212]) *Dreyer* e *Vollum*, The Lancet, 1, 1931, pag. 9.
([213]) *Elbert* e *Gelbert*, Ann. Inst. Pasteur, 44, 1930, pag. 48.
([214]) *Nektadimenko, Odrina, Syssak, Anguenistsky*, Ann. Inst. Pasteur, 45, 1930, pag. 54.
([215]) *Piosecka-Zeyland*, Ann. Inst. Pasteur, 43, 1929, pag. 1002.
([216]) *Tzeknwitzer*, Ann. Inst. Pasteur, 45, 1930, pag. 102.
([217]) *Christison*, Zentr. f. Bakt., 125, 1932, pag. 72.
([218]) *Petroff*, Ann. Rev. Tub., 20, 1929, pag. 275.
([219]) *Gratia*, C. R. Soc. Biol., 90, 1924.
([220]) *Einemann*, Jour. of Bact., 2, 1917, pag. 361.
([221]) *Cowan*, Brit. Jour. Exp. Past., 8, 1927, pag. 6.
([222]) *Mac Intosh* e *Fildes*, Med. Res. Comm. Spec. Rep., 12, 1918, pag. 29.
([223]) *Shippen*, Arch. Int. Med., 23, 1919, pag. 346.
([224]) *Reddish*, Jour. Inf. Dis., 29, 1921, pag. 120.
([225]) *Bennington*, Pub. Health. Rep., 37, 1922, pag. 2252.
([226]) *Hall*, Jour. of. Bact., 11, 1926, pag. 407.
([227]) *Fejgin*, C. R. Soc. Biol., 90, 1923, pag. 1381.
([228]) *Ibrahim* e *Schütze*, Jour. Exp. Path., 9, 1928, pag. 353.
([229]) *Fildes*, Brit. Jour. Exp. Path., 8, 1927, pag. 219 e 387.
([230]) *Smith* e *Reagh*, Jour. Med. Res., 10, 1903, pag. 89.
([231]) *Sachs* e *Schlossberger*, Arch. a. d. Kön. Inst. f. exper. Ther. zu Frankfurt. A-M. 1919, 7.
([232]) *Weil* e *Felix*, Zeit. .f Immun., 29, 1920, pag. 24.
([233]) *Weil*, Zeit. f. Immun., 31, 1921, pag. 50.
([234]) *Felix*, Jour. Immun., 9, 1924, pag. 115.
([235]) *Felix* e *Olitski*, Jour. Immun., 11, 1926, pag. 31.
([236]) *Braun* e *Nodake*, Zentr. f. Bakt., 29, 1926; 30, 1927.
([237]) *Pijper*, S. Afr. Med. Res., 1923, Febbr. 10-26; Jour. of Hyg., 29, 1930, pag. 380.
([238]) *Goyle*, Jour. Path. a. Bact., 30, 1927.
([239]) *Arkwright*, Jour. Path. a. Bact., 31, 1928.
([240]) *Arkwright* e *Pitt*, Jour. Path. a. Bact., 32, 1929.
([241]) *Schütze*, Brit. Jour. of. Hyg., 20, 1922, pag. 330; Arch. Hyg., 100, 1928, pag. 181.
([242]) *Lendsteiner* e *Furth*, Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. (N. Y.), 24, 1927, pag. 379.
([243]) *Scott.*, Jour. of. Hyg., 25, 1926, pag. 398.
([248]) *D'Herelle* e *Beecroft*, Jour. of. Bact., .n 1, 1932.
([249]) *Burnet*, Brit. Jour. Exp. Path., 8, 1927, pag. 121.
([250]) *Kuhn* e *Sternberg*, Zentr. f. Bakt. O., 121, 1931, pag. 113.
([251]) *V. Wasielewski* e *Kühn*, A. Zool. Jb. f. Anat., 38, 1914, pag. 253.
([252]) *Feulgen*, Die Nuklealfärbung. Handb. d. biolog. Arbeitsmethode, hrsg Abderhalden, S. 1055, Berlin-Wien.
([253]) *Kuhn* e *Sternberg*, Zentr. f. Bakt. O., 124, 1932.
([254]) *Platz*, Zeit. f. Hyg., 95, 1922, pag. 346.

([255]) *Vagedes V.*, Zentr. f. Bakt. O., 116, 1930, pag. 187.
([256]) *Klineberger,* Weichardt's Rrgebnin, 11, 1930.
([257]) *Koch M.*, Diss. Könisberg. Botan. Arch., 29, 1927.
([258]) *Ziegenspeck,* Ber. dtsch. bot. Ges., 47, 1929, pag. 50.
([259]) *Wilke,* Diss. Könisberg. Rot. Arch., 30, 1930.
([260]) *Wilke* e *Ziegenspeck,* Bot. Arch., 30, 1930.
([261]) *Drescl* e *Stickl,* Deut. Med. Woch., 1928, n. 13.
([262]) *Stichl,* Krkh. Forschg., 5, 1, 1927; Deut. Med. Woch., n. 28, 1927.

REVUÈ CONSULTÈ.

(1*) *Hadley,* Jour. of. Inf. Dis., 40, 1927, n. 1.
(2*) *Gotschlich,* Kolle e Wassermann, Hand. der Path. Mikroorg, 3ª ed., Bd. 1, 1927.
(3*) *Arkwright,* Rel. I Congr. Inter. de Microb., Paris 1930, T. 1, pag. 146.
(4*) *Dible,* Rec. advances in Bact. J. e A. Churchill ed., London 1929.
(5*) *Ledingham,* Rel. I Congr. Inter. de Microb., Paris 1930, T. 1, pag. 162.
(6*) *Rimpau,* Münch. Med. Woch., 51, 1931.
(7*) *Petri,* Boll. Sez. It. Soc. Int. Microb., II, 1930, f. VI, pag. 260.

PETRAGNANI G. – **La migration à travers la bougie filtrante comme excitant des phénomènes de dissociation.**

(Communication présentée au IVe Congrès Italien de Microbiologie, de Milan).

A l'occasion du précédent Congrès National de Microbiologie (avril 1931) j'ai fait une communication sur les « virus traversant et ne traversant pas les bougies poreuses ». Je démontrais alors que plusieurs microrganismes non filtrants, restés dans l'intérieur des bougies Chamberland L_2-L_3 comme résidu de la filtration dans les boules de Kitasato de 20 cmc. de cultures en bouillon, présentent la propriété particulière de progresser de l'intérieur de la bougie vers le liquide de culture quand, après la filtration, on ôte aseptiquement les bougies des boules de Kitasato et on les introduit dans des flacons d'Erlenmeyer appropriés, ayant un niveau élevé de liquide de culture. Maintenent, j'ai voulu reprendre ces essais afin de voir si la barrière poreuse interposée à la diffusion du germe dans le liquide de culture, peut constituer un bon excitant pour la dissociation bactérienne.

C'est pourquoi j'ai choisi (à l'aide de mon « appareil pour le contrôle préliminaire des bougies poreuses ») des bougies Chamberland L_3-L_5-L_{11} ayant une porosité voulue.

J'ai gardé ces bougies, pendant trois jours, dans un bain d'eau distillée, puis je les ai montées directement sur autant de fioles d'Erlenmeyer, où j'avais préalablement versé 250 cmc. de liquide de culture et où chaque bougie était plongée jusqu'à atteindre presque le fond du ballon. J'ai mis dans l'intérieur de chaque bougie le même milieu de culture que dans la boule. J'ai bouché chaque boule, au moyen d'un tampon de coton, ainsi qu'on fait pour les tubes ordinaires. Puis j'ai capuchonné

l'extrémité, avec du papier parcheminé que j'ai fixé par deux ligatures: l'une au niveau du col du flacon d'Erlenmeyer, l'autre à la base de la bougie. J'ai stérilisé le tout au four.

Les bougies contenant du bouillon de Löffler au pH = 7,2 ont respectivement reçu: cmc. 2 d'une culture en bouillon de 24 heures de: I) *Bac. prodigiosus;* II) *Bac. proteus* X°*;* III) *Brucella melitensis;* IV) *Brucella abortus;* V) *B. typhique;* VI) *B. coli;* VII) B. pyocyanique; VIII) B. de Shiga; IX) B. de Flexner; X) Vibrion cholérique; XI) B. du charbon; XII) Staphylocoque doré.

Les bougies montées dans les boules contenant du bouillon Martin ont reçu 2 cmc. d'une culture de Bac. diphtérique.

Celles qui étaient montées dans les boules avec du bouillon glycériné et celles renfermant du milieu de Sauton, ont reçu des émulsion ou de petits lambeaux de voiles de culture de différentes souches de B. tuberculeux.

Bien qu'au cours de ces épreuves je n'aie pas fait la filtration préalable, dans les boules de Kitasato, des suspensions bactériennes introduites dans les bougies, tous les germes mentionnés ci-dessus ont traversé, exception faite pour le B. du charbon, le B. diphtérique, le B. de Koch. Ce résultat cadre parfaitement avec celui que j'avais obtenu à la suite des essais de l'année passée.

Par ordre de vitesse, le développement se présente d'abord dans la boule contenant la bougie ensemencée avec le *B. proteus* et le B. typhique (36 h.), puis dans celles ensemencés avec le B. pyocyanique (40 h.), ensuite dans la boule du *B. coli* et du Vibrion cholérique (44 h.), et enfin dans celle du *B. prodigiosus* (70 h.).

Le B. de Flexner a nécessité 7 jours pour son développement; la B. Shiga 10 jours; la *Bruc. abortus* 30 jours; la *Bruc. melitensis* 31 jours; le Staphylocoque doré 47 jours.

Pour le *B. prodigiosus* j'ai préparé aussi, en partant de la culture en bouillon, âgée de quelques jours, l'ensemencement en des bougies poreuses L_{11}, montées, comme les autres, dans des boules avec du liquide de culture. Quant au *B. coli*, au B. de Flexner et au B. de Shiga, lorsque j'ai remarqué la culture du bouillon du premier ballon, j'ai ensemencé ½ cmc. de la culture en bouillon dans une autre bougie filtrante, montée de la même manière, et ainsi de suite, pendant quatre passages successifs.

Le liquide de chaque ballon qui présentait une culture, était soumis à l'examen en goutte pendante et à l'isolement sélectif sur plaques.

Résultats. — En général, la mobilité des germes traversant la bougie a été plus prononcée que celle des mêmes souches en bouillon ordinaire.

Quant au *B. coli*, au B. de Shiga et au B. de Flexner que j'ai fait

traverser quatre fois d'une bougie à l'autre, j'ai remarqué qu'en effet la mobilité du *B. coli* était augmentée, et que le B. de Flexner et le B. de Shiga présentaient un mouvement de translation toujours plus évident.

Le cas du *B. prodigiosus* ensemencé dans la bougie L_{11} a été particulièrement intéressant. La migration s'était effectuée a travers cette bougie seulement 16 jours après le séjour de la bougie à 20 degrés. Après avoir fait l'examen en goutte pendante du bouillon du ballon, et à peine notée la première apparition de culture, on a observé des formes bacillaires très longues (6-7 microns), isolées ou bien réunies en chaînes de deux - trois - quatre éléments. Tous ces éléments étaient doués d'un mouvement net de translation du type de celui du *B. proteus*, en comparaison duquel ils étaient pourtant plus rapides. En particulier, j'ai pu noter que certains éléments, s'arrêtant dans leur translation vers une direction donnée, prenaient, avec la même vitesse, la direction opposée, sans tourner sur eux-mêmes.

Les autres germes examinés en goutte pendante n'ont pas montré de caractères particuliers, mais pour le Vibrion cholérique, ainsi que pour le Bac. typhique, le mouvement en « essaim » a été une règle constante.

Les isolements en plaque ont mis en évidence que le *B. proteus* ayant traversé les bougies donnait seulement des colonies de la forme H, de Weil Felix, avec une tendance à l'étalement prononcée.

Le *B. prodigiosus* ayant traversé la bougie L_{11} a présenté un type de colonies H comme celles du *B. proteus*, dont j'ai relaté plus haut les caractères en goutte pendante. J'ai dû me convaincre qu'il ne s'agissait pas d'une souillure, en observant la pigmentation considérable et caractéristique présentée par les colonies isolées du bouillon du ballon, et la forte coloration rouge présentée par le même bouillon dès la 48ème heure depuis la migration.

Sur les isolements en plaques effectués après chaque migration en série à travers les bougies poreuses, avec le *B. coli*, le B. de Flexner et le B. de Shiga, j'ai pû constater que le type des colonies devenait toujours plus étalé et irrégulièrement bordé.

Quant à la *Bruc. melitensis* et à la *Bruc. abortus*, l'on a obtenu deux types de colonies, toutes les deux lisses et convexes, ayant une structure homogène, aux bords réguliers, mais opaques. Un type de colonie était plus gros que l'autre. Toutes les deux étaient représentées par un nombre égal de germes. Les micro-colonies ont poussé en retard et, même, après les avoir déterminées, au moyen d'isolement sélectifs, les plaques ont gardé leur caractère de micro-colonies. Les épreuves d'agglutination, spécifique et aspécifique, ont conduit aux résultats suivants: les cultures obtenues de micro-colonies de la *Bruc. abortus* et de la *Bruc. melitensis*

ont donné l'agglutination à la trypaflavine, tandis que cette dernière n'a pas agglutiné celles qui provenaient des grosses cultures.

Le chlorure de sodium a donné une agglutination incertaine de la culture en grosses colonies de *Bruc. melitensis* et de celle obtenue en partant de la micro-colonie de la *Bruc. abortus*.

En essayant avec du sérum agglutinant *anti-melitensis*, jusqu'au titre de 1: 3000ème la culture provenant de la grosse colonie de la *B. abortus*, elle a donné une agglutination au 1/1400; celle provenant de la micro-colonie est arrivée au taux de 1/3200.

La culture provenant de la grosse colonie de la *B. melitensis* a atteint le taux de 1/3200ème et celle de la micro-colonie, le taux de 1/1500ème.

Le pouvoir pathogène du Vibrion cholérique et du Bac. typhique ayant traversé les bougies poreuses n'a pas montré de variations. Il est à remarquer que, d'un prélèvement effectué sur un petit cobaye mort à la suite de l'injection intrapéritonéale de Vibrion cholérique passé à travers la bougie poreuse L_3, on a pu isoler sur plaque une colonie atypique, qui engendra une riche série de colonies modifiées. Celles-ci m'ont permis de faire des observations utiles, que je relaterai à part, dans une autre note.

Pour le Bac. diphtérique et le Bac. de la tuberculose j'avais employé des bougies Chamberland, gros modèle, pouvant contenir aisément 20 cmc. de liquide. Ces bougies étaient montées en des flacons d'Erlenmeyer de la capacité de plus d'un demi litre de liquide de culture chacun.

Après être resté pendant 20 jours à l'étuve, ces bougies ont montré ce qui suit: tandis qu'à l'intérieur des bougies contenant le Bac. diphtérique on observait un développement vraiment exceptionnel, un véritable amas de corps bacillaires dans le fond (évidemment à travers la bougie poreuse il se réalise un échange utile entre le liquide intérieur et celui de l'extérieur) on ne remarquait aucune modification organoleptique du liquide du ballon. La stérilité de celui-ci a été contrôlée par ensemencement sur milieu de Pergola et de Löffler. Après avoir aspiré, avec une pipette, le liquide intérieur de la bougie Chamberland, et filtré sur micro-Chamberland, on a déterminé sur le liquide filtré la dose mortelle pour le cobaye d'un poids de 200 grammes; elle a été determinée à 0, cmc. 5. Avec le liquide des ballons, où l'on avait plongé les bougies contenant le Bac. diphtérique, on a fait des épreuves analogues, mais aucun des cobayes inoculés (deux, avec un demi cmc.; deux avec un cmc.; deux: 2 cmc.; puis 4, 6, 8, 10 cmc.) n'a succombé. Néanmoins, chez les animaux qui avaient reçu une dose dépassant 5 cmc., on a remarqué un oedème considérable du tissus sous-cutané.

Vingt jours après l'injection on a essayé le degré de résistance de ces cobayes pour la toxine diphtérique. Dans ce but, j'ai inoculé un lot

de ces animaux avec 10 doses *minima* mort lles, et un autre lot avec 100 doses *minima* mortelles. Des cobayes appartenant au premier gruope, les animaux qui 20 jours avant avaient reçu de 2 à 10 cmc. de liquide contenu dans le ballon où l'on avait plongé la bougie filtrante ont survécu. Les cobayes qui ont été inoculés avec les 100 doses *minima* mortelles, ont succombé avec une certaine survie par rapport aux témoins. Il est donc légitime de penser que le Bac. diphtérique ne passe pas à travers la bougie poreuse, tandis qu'une certaine quantité de toxine diphtérique passe de l'intérieur de la bougie même vers le milieu de culture du ballon. Voilà un point qui mérite d'être ultérieurement étudié.

Les boules avec les bougies dans lesquelles on avait ensemencé les Bac. de Koch, étaient encore parfaitement limpides au bout d'un mois. Or, pour déterminer dans ces boules un léger mouvement de l'intérieur de la bougie vers le liquide du ballon, j'ai introduit aseptiquement, dans l'intérieur de chaque bougie, 10 cmc. du même liquide de culture stérile et, à l'aide d'une spatule, j'ai déposé dans chacune un petit lambeau d'enduit ou bien une émulsion de bacilles d'une nouvelle culture des mêmes souches tuberculeuses. Au bout d'un autre mois de séjour à l'étuve, n'ayant remarqué aucun changement dans les caractères organoleptiques des liquides de culture, je les ai ensemencés dans le milieu pour Bac. tuberculeux et j'ai injecté chaque liquide à deux cobayes, par la voie intrapéritonéale (10 cmc. pour cobaye). J'attends encore les résultats de ces épreuves.

On peut donc conclure que les germes traversant les bougies poreuses subissent une excitation dans leur évolution vers un type plus mobile. Si la migration à travers la bougie s'effectue en un très long délai à partir de l'ensemencement à l'intérieur de la bougie (par ex. les Brucella qui ne traversent qu'en un mois), les isolements sélectifs effectués à partir du bouillon du ballon donnent des formes de colonies modifiées comme l'a décrit Arkwright.

PETRAGNANI G. et MAZZETTI G. – **Cultures secondaires associées à la culture en bouillon du bac. de Koch et leur influence sur le bac. de Koch lui même.**

(Communication présentée au IVe Congrès Italien de Microbiologie, de Milan).

Nous rapportant aux expériences qu'un de nous avait déjà décrites, nous avons voulu voir si, en infectant des cultures de bac. de Koch à l'aide d'autres souches microbiennes, il était possible de remarquer des phénomènes de dissociation, soit aux dépens du bac. de Koch même,

soit au dépens des germes infectants. Nous parlerons à part de ce qui se rapporte à l'action excitante du bac. de Koch sur ces derniers: nous nous bornons, pour le moment, à décrire ce que nous avons observé aux dépens de la culture tuberculeuse et de ses éléments bacillaires.

1°) TECHNIQUE. — On exécute des réensemencements de voile tuberculeux de 18 jours, de la souche « Vallée » en de grands tubes de bouillon glycériné à 2%, à pH = 7,14.

Douze jours après, le bouillon des tubes, qui est encore tout à fait limpide, est couvert par des voiles de culture abondants et caractéristiques. On apporte, dans chaque tube, une oese de culture en bouillon de 24 heures des germes mentionnés ci-après, en ayant soin de ne pas casser et de ne pas faire enfoncer le voile tuberculeux.

On ensemença ainsi, en autant de tubes pourvus comme il est dit ci-dessus de leur voile tuberculeux: Typhique 95, *B. coli* A, Choléra Isonzo, Charbon Castelfiorentino, *Bruc. melitensis*, Staphylocoque 41, *Proteus* X_{19}, Pyocyanique, *B. prodigiosus* Cagliari, *Oedematiens*, Tétanos et *Phallax*.

Le tube infecté par le *Bac. prodigiosus* a été gardé à température ordinaire (15°-22°), tandis qu'on portait à nouveau les autres à l'étuve, à 37°.

On a gardé comme contrôles deux tubes de culture tuberculeuse, l'une à l'étuve, l'autre à température ordinaire.

De temps en temps, on a prélevé un fragment de voile superficiel (chez les cultures où il était conservé ou régénéré), ou du dépôt (dans les tubes dans lesquelles le voile s'était enfoncé et n'avait pas été régénéré).

Après l'avoir homogénéisé, on ensemençait le matériel en milieu Petragnani pour pouvoir apprécier une dissociation éventuelle des colonies, et connaître ainsi la vitalité des cultures infectées, vis-à-vis des tubes de contrôle.

On a rendu homogène le matériel prélevé des tubes de culture, en faisant agir la soude juste le délai *minimum*, nécessaire à tuer le germe.

En même temps on comparait aux tubes de contrôle les caractères macroscopiques des voiles tuberculeux, dont on faisait parallèlement l'examen microscopique sur une préparation au Ziehl-Neelsen.

Après chaque prélèvement, nous avons fait enfoncer, volontairement, en l'agitant, le voile tuberculeux (dans les tubes où ce phénomène ne s'était pas réalisé naturellement), afin de pouvoir observer dans quels tubes le bac. de Koch avait encore le pouvoir de le régénérer.

Après le dernier prélèvement on a déterminé au potentiomètre le pH de chaque tube.

2°) RÉSULTATS. — Dans tous les tubes infectés de la manière décrite plus haut, le bouillon, limpide d'abord, se troubla en montrant un développement remarquable du germe infectant.

Parfois le trouble (b. pyocyanique) fut plus intense que dans le tube de contrôle (culture du même germe en bouillon glycériné á 2%, sans culture tuberculeuse), parfois il a été égal (*B. prodigiosus*, *B. proteus* X_{19}), parfois un peu moindre que dans le tube de contrôle (B. typhique, *B. coli*, V. cholérique, Charbon, *B. melitensis*, staphylocoque).

Les anaérobies (tétanos, *oedematiens*, *phallax*) donnèrent un développement plus faible, par rapport aux tubes Tarozzi de contrôle.

Le voile tuberculeux ne changea pas et demeura apte à se régénérer dans les grands tubes contaminés avec du tétanos, du charbon, de la *B. melitensis*, de l'*oedematiens* et du *phallax;* au contraire, il a été amolli et dissocié particulièrement dans le tube avec le *B. coli* et le B. pyocyanique, un peu moins dans les tubes avec le B. typhique, le *B. proteus*, le staphylocoque et le *B. prodigiosus*. Dans le tube de contrôle à 37°, le voile s'est toujours formé de nouveau avec facilité, dans celui à température ordinaire il s'est reformé de même, mais bien plus lentement que dans le premier, à cause de la température à laquelle on l'avait gardé.

Dans les préparations microscopiques le bac. de Koch a gardé toujours intact son aspect microscopique et son acido-résistance.

Le tableau que nous donnerons après, montre pour chacun des tubes les résultats des différents ensemencements pratiqués de la manière déjà décrite. Dans toutes les grands tubes de milieu Petragnani, où l'on a eu le développement de colonies tuberculeuses, celles-ci parurent d'abord toutes semblables entre elles (punctiformes, blanchâtres), mais ensuite elles se partagèrent en deux types bien distincts:

1er Type: Colonies petites, d'un blanc-jaunâtre, saillie en coupole, à bords réguliers et à surface lisse.

2ème Type: Colonies larges, plates, grisâtres, peu en relief, à surface rugueuse. De ces colonies, quelques unes présentaient le centre légèrement relevé en coupole.

Dans certains tubes, les colonies avaient l'aspect des deux types en même temps.

Cette différence dans les types des colonies pourrait nous amener à croire à première vue, qu'une dissociation a eu lieu, du moins au point de vue morphologique.

Nous tenons, pourtant, à faire remarquer qu'on a retrouvé les deux types dans tous les tubes, y compris ceux qui avaient été ensemencés avec le matériel prélevé des tubes de contrôle; nous voulons encore faire observer que dès les premiers isolements et aussi dans les prélèvements du tube même, tantôt la culture a présenté toutes les colonies d'un même type, tantôt des colonies des deux types différents, sans que le fait parut lié à la progression ou à la régression du phénomène éventuel de dissociation.

De plus, on a exécuté (après une émulsion soignée d'une partie de la colonie ou de la culture en liquide de Sauton) en partant soit de colonies bien isolées et d'un type différent, soit de cultures qui appartenaient toutes aux deux types de colonies, des repiquages en gélose glycérinée à 2 %, en pomme de terre glycérinée, et en milieu Petragnani, afin de voir s'il était possible d'obtenir des souches pures du même type, de chaque colonie ou de chaque culture.

Des cultures mixtes ont été observées, avec des aspects tels, qu'on peut penser que la stabilité dans les deux types de colonies n'a pas été démontrée.

De même, nous n'avons pas de données sûres pour ce qui se rapporte à la propriété qu'offrent ces colonies de s'homogénéiser plus ou moins en solution physiologique.

De toutes ces expériences, nous avons tiré cette conclusion: à notre avis les deux types de colonies observés ne sont pas la marque d'un véritable phénomène de dissociation. Ce fait est intéressant, parce que les deux types observés correspondent à ceux que d'autres savants ont décrits et ont photographiés; on devrait, par conséquent, étudier davantage ce phénomène.

Nous sommes encore en train de faire des expériences chez les cobayes pour essayer la virulence des souches provenant des cultures qui dérivent des tubes tuberculeux, contaminés de différentes manières. Nous en ferons d'autres pour établir si les colonies de forme différente, obtenues dans le même tube de culture, ont un pouvoir pathogène différent.

Nous donnerons les résultats de ces expériences, aussitôt que possible.

Dans le tableau suivant sont groupés les résultats des différents ensemencements, et ceux qui se rapportent à la régénération du voile tuberculeux.

A notre avis, la constatation que nous avons faite, au sujet de la résistance différente du bac. de Koch dans les divers tubes où il eut la possibilité de pousser semble très importante. Nous voyons en effet que, tandis que le bac. de Koch était déjà mort après douze jours dans les tubes ensemencés respectivement avec le b. typhique, le b. pyocyanique et le *B. prodigiosus*, il était encore apte à se développer dans le tube contaminé de *B. coli*.

L'action différente des b. tétanique, *oedematiens* et *phallax* est intéressante chez les anaérobies aussi; tandis que le bac. de Koch paraît trouver dans le premier de ces bacilles un excitant à son développement, le *B. oedematiens* semble avoir une action assez nocive et le *B. phallax* paraît en avoir une, tout à fait bactéricide.

La régénération du voile tuberculeux se manifesta chez les anaérobies d'une manière tout à fait extraordinaire dans le tube contaminé

Tubes tbc. (pH = 7,14) infectés avec	1ère Lecture (après 6 jours)	2ème Lecture (après 12 jours)	3ème Lecture (après 18 jours)	4ème Lecture (après 24 jours)	5ème Lecture (après 30 jours)	6ème Lecture (après 60 jours)
Choléra	Le voile de la 1ère formation s'enfonce Culture +	Voile de 2e format. +	Voile de 3e format. +	Voile de 4e format. +	Voile de 5e format. +	— PH = 6,7 —
Typhus	Id. Culture +	Voile de 2e format. (±) —	— —	— —	— —	— PH = 6,4 —
Coli	Id. Culture +	— +	— —	— —	— —	— PH = 6 —
Melitensis	Id. Culture +	Voile de 2e format. +	Voile de 3e format. +	Voile de 4e format. (±) +	Voile de 5e format. (±) +	Voile de 6e format. (±) PH = 7,7 +
Pyocyanique	Id. Culture +	— —	— —	— —	— —	— PH = 6,7 —
Proteus X 19	Id. Culture +	Voile de 2e format. (±) +	Voile de 3e format. (±) —	— —	— —	— PH + 6,7 —
Staphylo-coque	Id. Culture +	Voile de 2e format. +	Voile de 3e format. —	Voile de 4e format. (±) —	— —	— PH = 7,6 —
Charbon	Id. Culture +	Voile de 2e format. +	Voile de 0e format. +	Voile de 4e format. +	Voile de 5e format. +	Voile de 6e format. PH = 6,5 +
Prodigiosus (à 15°-22°)	Id. Culture +	Voile de 2e format. (±) —	— —	— —	— —	— PH = 6,8 —
Tétanos	Id. Culture +	Voile de 2e format. +	Voile de 3e format. +	Voile de 4e format. +	Voile de 5e format. +	Voile de 6e format. PH = 6,8 +
Oedematiens	Id. Culture +	Voile de 2e format. +	Voile de 3e format. +	Voile de 4e format. +	— +	— PH = 6,5 —
Phallax	Id. Culture	Voile de 2e format. (±) +	Voile de 3e format. (±) —	Voile de 4e format. (±) —	— —	— PH = 6,8 —
Contrôle n. 1 (à 37°)	Id. Culture +	Voile de 2e format. +	Voile de 3e format. +	Voile de 4e format. +	Voile de 5e format. +	Voile de 6e format. PH = 7,8 +
Contrôle n. 2 (à 15°-22°)	Id. Culture +	— +	— +	Voile de 2e format. +	— +	Voile de 3e format. PH = 7,5 +

avec le b. tétanique, et chez les aérobies dans celui infecté avec le b. charbonneux, qui se développa à son tour d'une manière vigoureuse, sur la face inférieure du voile tuberculeux. La seule différence vraiment remarquable était dans la consistance plus molle du voile. On eut aussi un pouvoir de régénération médiocre dans les tubes avec la *B. melitensis* et le vibrion cholérique.

En d'autres tubes, on remarqua la constitution d'un voile: il a été difficile de définir s'il appartenait au bac. de Koch ou au germe infectant qui aurait aggloméré par ses éléments les fragments du voile tuberculeux primitif, revenus à la surface. Ce soupçon nous paraît confirmé par le fait que les cultures de ces voiles douteux ont été presque toujours négatives.

De toutes ces expériences on peut faire ressortir le grand intérêt présenté par cette différence de vitalité du bac. de Koch en contact avec différents microrganismes, aptes à pulluler d'une manière considérable dans le bouillon à pH = 7,14.

On doit attribuer, sans doute, une partie de ces différences dans la manière de se comporter, aux modifications du pH, très variables suivant les germes infectants.

Il paraît qu'une véritable symbiose s'établit dans la culture contaminée par le B. du charbon qui vit parfaitement en contact avec le B. de Koch lequel, de son coté, n'en éprouve aucun dommage.

Le pouvoir bactéricide différent du vibrion du choléra, du *B. coli* et du B. typhique est aussi très intéressant. De nombreuses expériences sont toutefois encore nécessaires pour que l'on puisse considérer comme définis les différents aspects des cultures ainsi associées.

MAZZETTI G. – **Les variations dans l'aptitude de reproduction " in vitro " du B. de Koch.**

(Communication présentée au IVe Congrès Italien de Microbiologie, de Milan).

Au cours de quelques expériences, j'ai eu l'occasion d'observer que le liquide de Sauton, qui représente dans sa composition normale et tel qu'il est connu en général, un excellent milieu pour le développement du B. de Koch, ne se montrait pas ainsi bon lorsqu'il était solidifié par l'adjonction d'une certaine proportion de gélose.

En étudiant mieux ce qui pouvait déterminer ce phénomène, j'ai cru pouvoir l'attribuer à l'action combinée de trois causes:

1°) le type auquel appartenait la souche ensemencée (souche de boeuf Vallée);

2°) la proportion de gélose ajoutée au milieu de Sauton (2 %);

3°) la qualité du milieu sur lequel s'était développée la culture qui avait servi à l'ensemencement (gélose glycérinée à 2 %).

Pour m'éclairer personnellement à ce sujet, j'ai voulu faire d'autres expériences en employant:

a) Une souche de boeuf (Vallée) et deux souches humaines (Landis, Pediatria) dont je connaissais la bonne aptitude à fournir d'abondantes cultures sur les milieux communs pour le bacille de Koch (milieu Petragnani, gélose glucérinée à 2 %, pomme de terre glycérinée et liquide de Sauton);

b) Trois séries de gross tubes contenant respectivement du milieu de Sauton à pH = 7,2, solidifié par addition de l'1, 1,5 et 2 % de gélose;

c) Quatre cultures jeunes, pour chaque souche (20 jours environ), chacune d'elles provenant d'un terrain de culture différent (milieu Petragnani, gélose glycérinée à 2 %, pomme de terre glycérinée, liquide de Sauton).

On obtient d'une manière très simple le milieu de Sauton solidifié, par la même technique utilisée pour préparer la gélose ordinaire à partir du bouillon de Löffler. Les grosses éprouvettes qui contiennent le Sauton gélosé à l'1, 1,5 % doivent être gardées toujours horizontales, pour éviter que le milieu ne tombe au fond du tube.

Pour cette expérience, on employa la technique suivante:

Des quatre cultures différentes de chaque souche, on transporte une certaine quantité de l'enduit développé à la surface dans un tube stérile, contenant un peu de sable de quartz et une certaine quantité de liquide de Sauton. On ferme le tube à la flamme et on secoue fortement jusqu'à obtenir une émulsion tuberculeuse assez épaisse et homogène. On ouvre le tube de nouveau et l'on ensemence quatre grosses oeses à la surface du milieu de Sauton gélosé à l'1, 1,5 et 2 %.

Une même quantité d'émulsion est ensemencée en autant de tubes de Sauton liquide (tubes de contrôle). On met tous les tubes à 37°. On garde ceux qui renferment la gélose-Sauton dans la position horizontale: on les laisse avec la seule protection du tampon de coton pendant 24-28 heures afin que la surface du milieu se sèche un peu et enfin, on les capuchonne au caoutchouc.

Le résultat de cette expérience fut le suivant: tandis que dans les tubes de Sauton liquide on eut, après une dizaine de jours environ, le développement d'un riche voile tuberculeux, dans les 36 tubes de gélose-Sauton on constata que trois colonies seulement s'étaient développées, c'est-à-dire:

a) après 12 jours la colonie de gélose-Sauton à 1% ensemencée avec une culture en Sauton liquide, de la souche Vallée;

b) après 18 jours, une colonie sur tube de gélose-Sauton à 2%, ensemencée avec une culture sur milieu Petragnani, de la souche Vallée;

c) après 21 jours, une colonie sur tubes de gélose-Sauton à l'1,5% ensemencée avec une culture sur Sauton liquide, de la souche Landis.

Les deux colonies sur gélose-Sauton à l'1, 1,5% se développèrent ensuite, de manière à occuper 2/5 environ de la surface du milieu: elles prirent l'aspect d'un choux-fleur avec un tel développement en hauteur qu'elles atteignaient presque la paroi supérieure de l'éprouvette. La colonie sur gélose-Sauton à 2% demeura, par comparaison avec les deux autres, atrophiée et se développa peu, soit en largeur, soit en hauteur

Les préparations à la Ziehl-Neelsen ne montrèrent aucune modification, ni dans l'aspect, ni dans les affinités colorantes des éléments bacillaires.

On démontrait ainsi la grande difficulté du Bac. tuberculeux humain et bovin (de quelque milieu de culture qu'il provienne antérieurement), â croître sur milieu de Sauton solidifié. De toute la grande quantité d'éléments bacillaires ensemencés, au total, dans 36 tubes de gélose-Sauton, trois éléments bacillaires seulement s'étaient montrés capables de se reproduire. Tandis que les deux colonies poussées sur gélose-Sauton à 1-1,5%, après avoir vaincu les premières difficultés, purent se développer avec une vigueur inaccoutumée; celle qui s'était développée sur gélose-Sauton à 2% ne parut point trouver des conditions favorables à son développement ultérieur. C'était la preuve d'une manière très évidente que l'action empèchant le développement du bac. de Koch sur gélose-Sauton était, en partie, en relation avec le pourcentage de gélose ajouté, et amenait à croire que, une fois adapté à ces conditions de culture particulières, le Bac. de Koch ne trouvait plus d'autres obstacles à son développement.

Les épreuves suivantes ont démontré que ces hypothèses étaient bien fondées.

En effet, on ensemença sur gélose-Sauton, à 1-1,5 et 2% une partie de la colonie qui s'était développée sur gélose-Sauton à 1%, en utilisant la technique décrite plus haut. Cette fois, on obtint des résultats très différents des premiers: une dizaine de jours après, un riche enduit s'était développé sur le tube à 1-1,5%. Trois colonies seulement se développèrent, au contraire, dans le tube à 2%, confirmant ainsi ce qu'on avait pu déduire des premiers essais.

Un repiquage semblable, du tube de Gélose-Sauton à 1% du deuxième ensemencement, donna des résultats presque identiques: on eut

aussi l'occasion d'observer que le temps qui s'écoulait entre l'ensemencement et le développement s'était encore raccourci (premier développement visible après 56 heures) et que le milieu de gélose-Sauton à 2% se montrait encore peu favorable au développement (deux colonies seulement se sont développées).

Je suis en train de faire des expériences sur des cobayes, pour voir s'il y a des différences dans le degré de pouvoir pathogène entre la culture en milieu Sauton liquide et les colonies issues du premier isolement. Je ferai dès que possible la relation de ces expériences.

L'explication des facteurs qui déterminent ce phénomène demeure toujours difficile, quel que soit le résultat de ces expériences, soit qu'il nous amène à admettre une sélection d'éléments plus virulents, ou d'éléments mieux adaptés à la vie saprophytique, soit qu'il nous amène à reconnaître un simple fait d'adaptation. Il suffit, en effet, de se rapporter d'une part, à l'abondance des cultures obtenues dans le milieu initial (liquide de Sauton), et, d'autre part, par ex. au fait que les souches étudiées sont aptes à se développer sur gélose à 2% glycérinée d'une manière vigoureuse (ainsi qu'on le constate dans l'expérience courante que nous en avons à notre Laboratoire) pour que toute explication soit évidemment impossible, pour le moment.

Un éclaircissement, partiel du moins, ne sera donné que par les résultats des expériences biologiques.

DADDI G. – **Sur la variabilité du B. prodigiosus.**

(Communication présentée au IV° Congrès Italien de Microbiologie, de Milan).

Dans cette communication, son relatés brièvement les résultats de quelques recherches faites sur la variabilité d'une souche de *B. prodigiosus*, isolé des eaux d'une source et gardé dans notre Institut depuis environ dix ans; il s'agit du *B. prodigiosus Siena.*

En partant d'une bouillon-culture (pH = 7,2) de trois jours de développement à 20° (c'est-à-dire d'une culture en conditions de vitalité les meilleures) nous sommes parvenus, par une série d'isolements sélectifs, et en prélévant les germes des colonies qui présentaient déjà des caractères en évolution, à identifier les divers types suivants, que nous avons classé comme il suit d'après leur différence de pouvoir chromogène: 1°) rouge; 2°) rouge hyalin; 3°) rouge muqueux; 4°) doré; 5°) rose; 6°) rose pâle; 7°) blanc; 8°) blanc muqueux.

Seuls, le 2ème et le 4ème type des variations obtenues se sont montrés

stables, car, même après 30 et 25 isolements sélectifs auxquels ils ont été respectivement soumis, ils n'ont montré ni un retour vers la culture de départ, ni une production de variations nouvelles.

Les types: 3°) muqueux rouge; 6°) rose pâle et 8°) blanc muqueux sont démeuré stables pendant les huit isolements subis.

Les types: 1°) rouge; 5°) rose et 7°) blanc, ont montré, au contraire, une tendance nette à se transformer en l'un ou l'autre type. Cette tendance, pour le *rouge*, se manifestait par une moyenne, sur chaque plaque, de 20% environ de colonies mélangées de blanc; pour le *blanc* par une moyenne d'environ le 10% de colonies mélangées de rouge. On doit pourtant faire remarquer que les colonies bigarrées ne sont pas apparues dans tous les isolements; par exemple, au cours d'une série d'isolements du type *blanc*, après avoir obtenu plusieurs fois des colonies bigarrées, on a rencontré, dans un ou deux isolements, des colonies blanches et, ensuite encore, une série de plaques avec des colonies bigarrées. De cette façon on pourrait penser que, au cours des repiquages, les souches en question traversent des périodes de variabilité plus ou moins importante.

A l'examen morphologique, on a constaté que la *variété hyaline* se différencie de toutes les autres par une forme bacillaire nette, et en ce qu'elle est pourvue de nombreux cils long (4 à 8). En examinant les éléments de cette variété en goutte pendante, on remarque leur extrême mobilité.

En ce qui concerne le type des colonies, nous pouvons affirmer que la souche hyaline forme des colonies ayant tendance à s'étaler en surface (parfois jusqu'à recouvrir, même avec peu de colonies, une plaque entière); ces colonies sont très minces et transparentes comme du verre. Quoique dans une mesure bien moindre, la souche rose pâle et celle dorée forment elles aussi des colonies étalées en surface.

Les cultures sur gélatine ont permis d'identifier, dès le premier isolément, à côté de colonies rouges ayant un pouvoir de liquéfaction normal, d'autres, également rouges, mais dont le pouvoir de liquéfaction était tout à fait réduit et se manifestait très tardivement.

De ces dernières l'on a pu faire dériver une souche *non liquéfiante* qui, même au cours des isolements pratiqués après une série de repiquages sur gélose inclinée, se montra constituée, d'une façon homogène, de germes *presque* dépourvus de pouvoir liquéfiant. Pareillement la souche blanc muqueux ne liquéfie pas la gélatine.

Avec la souche de *B. prodigiosus Siena*, non dissociée, et avec toutes ses variantes: rouge, rouge muqueux, rouge hyalin et blanc, on prépare autant d'immun-sérums sur lapins. En essayant, par des épreuves d'agglutination, toutes les variétés de souches avec chacun des immun-sérums obtenus, on a constaté qu'entre les souches modifiées elles mêmes, il

existe des rapports sérologiques évidents. En effet, elles sont toutes susceptibles, quoique à des taux différents, d'être agglutinées par tous ces sérums. De plus, elles ont toutes montré, au cours des épreuves d'absorption, le pouvoir de fixer non seulement les agglutinines homologues, mais même une partie des autres. En général, l'absorption faite à l'aide de la souche correspondante fixait la plus grande partie des agglutinines des sérums. Au cours de nombreuses épreuves d'absorption, on a constaté, portant, que les anticorps vis à vis du *B. prodig. Siena* non dissocié et vis à vis de la variété rouge et rouge muqueux se laissaient fixer très facilement; ce qui permettrait de penser qu'entre la souche originaire fortement pigmentée et ses variantes plus chromogènes il existe des affinités particulières.

En résumé: l'A., par la simple sélection, a pu dissocier une souche de *B. prodigiosus* en 9 variétés, entre lesquelles existent des rapports d'affinité sérologique, qui confirment leur origine commune.

Les recherches faites par l'A., ainsi que celles de Beijerinck, Eisenberg etc., montrent la multiplicité des formes évolutives que l'on peut rencontrer dans les souches du *B. prodigiosus*.

VANNI S. – **Recherche des variations dans les cultures normales en bouillon de B. coli.**

(Communication présentée au IVe Congrès Italien de Microbiologie, de Milan).

L'étude de la variabilité bactérienne présente une grande importance lorsqu'elle se rapporte à des espèces ayant des caractères bien définis; mais cette importance n'est pas moins considérable lorsqu'il s'agit de groupes bactériens manquant d'unité qui, naturellement, ont plus de tendance à présenter des phénomènes d'évolution.

Le *B. coli* appartient plus particulièrement à ce genre et, comme j'avais à ma disposition des souches de *B. coli*, déjà étudiées quant à leur valeur et à leurs rapports antigéniques, j'ai trouvé particulièrement utile de:

1°) rechercher leur tendance à se dissocier en cultures en bouillon dans lesquelles on peut penser réaliser le *maximum* d'activité proliférative;

2°) rechercher une stimulation éventuelle à la dissociation, due au vieillissement des cultures en bouillon à température ordinaire, ce qui arrive normalement, dans l'étude de toutes les bactéries.

Dès que sera connue l'étendue du phénomène des variabilités pour

chaque souche ainsi étudiée, je me propose de rechercher ensuite son rapport éventuel avec le pouvoir antigénique déjà connu (Daddi, *Boll. de l'I. S. M.*, 1932. Fasc. II et IV, pp. 120, 127, 259).

Caractères fondamentaux des souches à l'examen. — Les souches de *B. coli* utilisées (isolées des fécès humains, et entretenues par repiquages pratiqués tous les 2 à 3 mois sur gélose ordinaire) ont été au nombre de neuf, distinguées les unes des autres par leur numéro de collection: 5, 6, 7, 14, 15, 17, 25, 36, 37.

Elles avaient perdu presque totalement leur aptitude à produire de l'indol; mais, exception faite pour le N.º 15 qui ne fermentait pas le lactose, elles gardaient toutes les autres propriétés caractéristiques de leur groupe, c'est-à-dire: peu de mobilité, Gram-négatif, fermentation du glucose et du lactose, réduction du rouge neutre, pas de liquéfaction de la gélatine. Lorsque les colonies étaient ensemencées sur plaques de gélose elles présentaient des caractères normaux.

Epreuves de dissociation par des repiquages quotidiens en bouillon. — Les neuf souches ont été repiquées quotidiennement, pendant vingt jours, en bouillon ordinaire préparé avec l'extrait de viande Lab-Lemco et au pH 7,2 établi au potentiomètre.

Le 20ème jour, on a procédé à l'isolement sélectif sur plaques de gélose, de chaque souche en partant de sa culture en bouillon (1). Des N.º 5, 6, 14, 17, 25, 36, 37, je n'ai obtenu que des colonies du type *S*; le N.º 15 a donné, parmi les colonies *S* quelques colonies opaques et ayant une structure légèrement granuleuse visible à l'examen microscopique; mais, tout en ayant essayé de réaliser différents isolements sélectifs en série, je n'ai jamais pû constater une progression vers le type *R*.

La souche N.º 7, dès son premier isolement, a présenté quelques colonies ayant des caractères prononcés propres au type intermédiaire *Rs*, dont j'ai pu obtenir, après quatre isolements sélectifs en série, des colonies *R* typiques. Ces dernières ont montré une agglutination granulaire en solution de NaCl 0,85 % et à la trypaflavine à 1 ‰, tandis que la souche modifiée qu'on en avait obtenue se montra, pour ce qui en est des caractères microscopiques, de coloration et fermentatifs, semblable au type *S*.

Recherche de formes modifiées des cultures en bouillon laissées vieillir pendant 15 *jours à température ordinaire.* — En partant des cultures de la collection des neuf souches ci dessus, on a pratiqué un repiquage en bouillon normal et les tubes, au bout de 24 heures de développement à

---

(1) Les isolements sélectifs ont été toujours pratiqués en émulsionnant soigneusement une pointe d'aiguille d'enduit bactérien, ou une oese de culture en bouillon dans 5 cmc. de bouillon et en étalant, à l'aide d'une spatule stérile une petite oese de cette émulsion sur une plaque de gélose dépourvue d'eau de condensation.

l'étuve à 37° C., ont été laissés à la température ordinaire pendant 15 jours. On a constaté alors que dans les cultures en bouillon des N.° 5, 7 et 15, il y avait toujours un trouble particulièrement uniforme et on n'a observé qu'un dépôt très réduit; dans la culture en bouillon des autres souches on voyait un voile superficiel et un dépôt considérable, granulo-floconneux.

Au 15ème jour, on a commencé à faire les isolements sélectifs qui ont montré une uniformité absolue de colonies du type *S* dans les souches 5, 7, 15, 36 et 37.

Les N.° 6 et 17 se sont comportés tous deux de même. Dès le premier isolement, on avait constaté, parmi un grande quantité de colonies hyalines homogènes (type *S*), la présence de colonies particulièrement opaques, et qui, laissées à la température ordinaire, montraient, après 48 heures de développement à l'étuve, un halo de régénération particulier qui, au microscope, décelait une granulosité fine (type *Rs*). Par des isoléments ultérieurs on n'a pas réussi à déterminer en partant de ces colonies, un type *R* pur; au contraire, on a constaté une réversion progressive vers la forme *S*.

Lorsqu'on a effectué sur ces colonies de type intermédiaire, l'épreuve de la trypaflavine, elles ont donné l'agglutination en granulations fines, tandis qu'en solution de NaCl 0,85% elles étaient presque totalement stables (flocons menus extrêmement rares). Les souches dérivées de ces colonies gardaient les caractères de la souche originaire.

Le N.° 14 montra, dès le premier isolément, un pourcentage élevé de formes intermédiaires qui, après quatre isolements successifs ont engendré 10% de colonies du type *R*. L'enduit bactérien de ce type était très sec et on ne parvenait pas à l'émulsionner dans les liquides, de sorte qu'il fut impossible de procéder aux épreuves de l'agglutination aspécifique en solution de trypaflavine et de NaCl. La culture en bouillon de ce type *R* donnait lieu au développement d'un voile superficiel résistant, tandis que le liquide demeurait presque limpide; tous les autres caractères fondamentaux étaient conservés.

Lors du premier isolement sélectif le N.° 25 a engendré non seulement des colonies *S*, mais aussi des colonies extrêmement atypiques qui, à température ordinaire, donnaient des prolongements marginaux en secteur, nettement rugueux, dont on put obtenir, au bout de trois sélections, des formes typiques.

L'enduit des colonies *R* de cette souche — à la différence de la souche 14 *R* — pouvait être, par des moyens appropriés, émulsionné dans les liquides et on put observer ici l'agglutination en petits flocons, soit dans la solution de trypaflavine, soit dans le NaCl à 0,85%. La culture en bouillon de la souche 25 *R* montrait des granulations adhérentes à la paroi du tube, en dépôt au fond et suspendues dans le liquide presque limpide: les autres caractères fondamentaux, propres au groupe, étaient inaltérés

Conclusions. — De ces épreuves il ressort déjà que dans le groupe des *B. coli* les processus dissociatifs peuvent être décélés, même à l'aide du simple isolement sélectif, par les cultures en bouillon provenant d'une longue série de repiquages quotidiens sur un milieu dont les propriétés nutritives ne sont pas épuisées.

Ce fait se réalise plus fréquemment lorsque l'isolement sélectif est fait à partir de cultures en bouillon que l'on a laissé vieillir pendant 15 jours seulement.

Or, tandis que ces épreuves apportent une contribution à l'interprétation du déterminisme du phénomène dissociatif, elle ne constituent aucunement — à mon avis — un sujet de préoccupation pour la pratique de la conservation des souches bactériennes. En effet, il faut considérer que l'existance de variations, qu'on a pu décéler dans les souches soumises aux recherches en question, ne porte, en réalité, que sur une partie infinitésimale de la culture intégrale. Elles ne peuvent être démontrées que par des recherches et des sélections successives très suivies.

G. BONOMINI. - **Recherches des variations dans les cultures du bacille d'Eberth-Gaffky.**

(Communication présentée au IVe Congrès Italien de Microbiologie, de Milan).

Dans le but d'entreprendre une étude sur les phénomènes de dissociation du B. typhique, je me suis proposé d'examiner les souches qui existent dans la collection du Laboratoire. J'ai eu à ma disposition 28 cultures différentes (du n. 1 au 14, du n. 95 au 108). Le premier groupe de 14 souches (de 1 à 14) existait depuis longtemps dans la collection et j'en ignore complètement l'histoire; le second groupe (de 95 à 108) était composé de souches isolées par moi même, sur milieu Wilson Blair, des fécès d'individus atteints de typhoïde aux diverses époques de la maladie, au cours des saisons d'automne 1929 et 1930. Ces souches avaient été entretenues par des repiquages mensuels sur gélose ordinaire à 2% et à pH = 7,4.

Avant de procéder à l'examen des colonies, j'essayai les diverses souches avec du sérum fortement anti et j'étudiai leur manière de se comporter vis-à-vis d'une solution de Na Cl à 0,85% et de trypaflavine à 1°/°° d'après la technique d'Alessandrini et Sabatucci.

Toutes les souches se laissèrent agglutiner par le sérum anti (agglutination floconneuse) et toutes manifestèrent leur stabilité dans une solution de Na Cl et de trypaflavine, exception faite pour le n. 103 qui

me donna, au contrôle, une agglutination spontanée (solut. fix. 0,90%) dans une solution de Na Cl à 0,85% et dans une solution de trypaflavine à 1°/°°.

Les essais d'agglutination aspécifique faits en partant de cultures en gélose âgées de 24 et de 60 jours, me donnèrent des résultats semblables et superposables.

Les cultures sur gélose, âgées de quatre mois, préparées avec les 28 souches furent analysées par de soigneux isolements sur plaques (1)

Des n°s. 2, 5, 9, 10, 11, 12 et 13 (du second groupe), j'obtins seulement des colonies du type S.

Des n°s. 1, 3, 4 et 14 (premier groupe) et 96, 99, 108 (second groupe), j'obtins, avec un pourcentage élevé de formes S, des colonies pouvant se rattacher aux types intérmédiaires RS et SR.

Des n°s. 95 et 101, se développèrent quelques colonies R parmi les colonies S, dans la proportion de 1/200. On trouva le n.° 103 complètement (100%) et spontanément dissocié sous la forme R.

Sept souches du premier groupe (n°s. 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101) furent passées quotidiennement, 25 fois de suite, dans du bouillon Lemco à pH = 7,2.

Les repiquages d'un bouillon à l'autre étaient faits après avoir secoué la culture. Je pus observer de temps en temps, tantôt dans une souche, tantôt dans l'autre, la formation d'un voile superficiel, ou de petites granulations suspendues dans le liquide trouble.

Les plaques de gélose, préparées de ces sept souches après le 25ème passage, me donnèrent un pourcentage élevé de formes S et quelques formes intermédiaires SR et RS; celles ci avaient une tendance particulière à former des prolongements marginaux qui très souvent reproduisaient les caractères de la colonie mère. D'autres nombreux isolements sélectifs, faits en utilisant toujours les mêmes bouillons et géloses au pH = 7,2, ne me donnèrent cependant pas de formes dissociées R.

Après avoir laissé une culture en bouillon, obtenue d'une colonie fille du n°. 98, pendant 30 jours à la température ordinaire et l'avoir isolée, je pus décéler 4 colonies R, sur 50 intermédiaires.

En faisant des isolements sélectifs à partir des bouillons de cultures du 28ème passage des sept souches ci-dessus, je ne pus constater, après 4, 35 et 65 jours de séjour à l'étuve, que la naissance de formes S.

---

(1) Pour les isolements nous avons suivi constamment la technique suivante:

Emulsion rapide d'une pointe d'aiguille du voile de culture en bouillon. Pour toutes ces recherches le bouillon a été préparé avec de l'extrait de viande Lab-Lemco (au pH = 7,2, toujours soigneusement déterminé à l'aide d'un potentiomètre au calomel); ensemencement d'une petite oese de cette émulsion sur plaques de gélose, dépourvues d'eau de condensation. Etalement avec une spatule stérile. Culture à 37° C à l'étuve.

Les épreuves étaient considérées valables seulement lorsque le nombre des colonies, dans une boîte de Petri de 12 cm. de diam., dépassait 50 à 100.

La réaction à la trypaflavine (essayée avec des cultures sur gélose que j'obtins des cultures ci-dessus en bouillon, dans le même intervalle de temps indiqué pour les isolements, a toujours donné des résultats négatifs, tout en confirmant la variation manquée des souches, qui résultait déjà des ensemencements sur plaque.

Par 7 passages, espacés de trois en trois minutes, dans des tubes contenant 20 cc. de bouillon ordinaire des souches n°s. 7, 14, 108, j'obtins des colonies S et RS des souches 7 et 108, et une colonie R (sur 120 S) de la souche 14.

Il paraît donc que le phénomène dissociatif marche plus facilement et même avec de l'accélération, en adoptant des cultures qui soient la plupart constituées en milieux liquides; mais les essais sont trop modestes pour permettre une conclusion formelle.

En résumé, on a pu obtenir les types R et S des n°s. 95, 98, 101, 108 et le type R du n. 103, spontanément dissociés dans la culture de la collection.

Par des ensemencements dans du lait des différentes souches R et S, et par des isolements pratiquées après un séjour à 37 C., je ne constatai dans les diverses souches ni une rétrogression R-S, ni une dissociation S-R. Ces résultats concordent avec l'opinion de Zlatogoroff qui emploie le lait comme stabilisateur des souches variées.

Le passage par animal des souches pures R 95, 98, 101 et 103 ne provoque pas la réversion vers la forme S. Des isolements sélectifs pratiqués en partant du liquide péritonéal, prélevé 6 et 24 heures après l'injection de 1 cmc. de bouillon-culture de 20h, montrent la croissance constante de colonies R typiques (100%).

Au contraire, le passage par animal des souches 98 et 101 détermina la présence des types intérmédiaires Rs et Sr.

Au cours de ces essais, je pus encore observer que les formations R des n°s. 95, 98, 101 et 103 étaient parfaitement exemptes de virulence, tandis que les formations S des n°s. 95, 98 et 101 étaient virulentes.

L'ensemble de ces remarques peut nous faire aboutir aux conclusions suivantes:

Le phénomène dissociatif du B, d'Eberth, peut se vérifier spontanément dans les anciennes cultures sur gélose, mais cependant ce résultat s'observe assez rarement.

Les repiquages fréquents en bouillon donnent une augmentation de la réaction S.

Dans ces essais, la conservation dans le lait donne la stabilisation des variations.

Le passage par animaux de la forme R pure, n'a pas détérminé sa reversion en S.

Le phénomène dissociatif du B. d'Eberth-Gaffky peut être mis en évidence dans des milieux de culture normaux, avec un pH oscillant autour du point neutre (pH = 7,2).

CERRUTI CARLO F. – **Recherche et identification des bacilles méta-dysentériques.**

(Communication présentée au IVe Congrès Italien de Microbiologie, de Milan).

Les investigations cliniques et bactériologiques qui ont été faites au cours de ces dix dernières années, ont permis de rapporter la cause de plusieurs affections intestinales caractérisées par des symptômes d'entéro-colite dysentérique plus ou moins prononcés, à un groupe de bacilles dénommés par Castellani « bacilles méta-dysentériques ». Ce groupe comprend plusieurs espèces bactériennes qui, par quelques uns de leurs caractères génériques sont proches des bacilles dysentériques proprement dits (B. de Shiga-Kruse, de Flexner, de Hiss-Russel), mais s'en détachent pourtant, surtout par leurs propriétés sérologiques et aussi parce qu'elles attaquent le lactose avec production d'acides seuls, et acidifient, et, dans la plupart des cas, coagulent lentement le lait.

Au point de vue bactériologique, les bacilles méta-dysentériques ont été récemment (Cerruti) étudiés et classés dans un genre à part, pour lequel on a proposé le nom de « Castellanus ». Au point de vue médical, les deux types de bacille métadysentérique, c'est-à-dire le « Castellanus castellanii Cerruti » (= *B. ceylonensis B.* Castellani, 1906) et le « Castellanus castellanii, var. kruse-castellanii » (= *B. ceylonensis A*, Castellani, 1906) ont une importance particulière, d'autant plus que l'étude comparative des propriétés biochimiques et sérologiques de nombreuses souches représentant le bacille dit « B. de Sonne » et la race *E* des B. pseudo-dysentériques de Kruse, a permis (Cerruti) d'établir que ces souches sont identiques aux variétés Kruse-Castellani des B. méta-dysentériques. Cette identification augmente l'importance clinico-épidémiologique de cette espèce bacillaire, car elle fait remonter à l'espèce même, l'origine des nombreux foyers épidémiques et de plusieurs cas sporadiques de dysentérie ou, plus simplement, des syndrômes diarrhéiques ou entéro-colitiques, fébriles ou non, aigus ou bien chroniques, qui ont été observés et décrits, dans les différents pays, comme étant dûs au B. de Kruse, ou au B. de Sonne.

L'A. veut rappeler l'attention sur l'importance d'un diagnostic exact dans des cas semblables, soit au point de vue thérapeutique, soit pour

la prophylaxie. Dans les cas subaigus et chroniques, la recherche du pouvoir agglutinant du sérum du sang du malade vis à vis des souches authentiques de *Cast. castellanii* et de *Cast. cast.* var. *kruse-castellanii* est le moyen de diagnostic le plus rapide et le plus sûr. Etant donné le pouvoir agglutinogène que ces espèces bactériennes montrent habituellement, le titrage du pouvoir agglutinant peut être très élevé et atteindre même des diluitions de 1/400, 1/500, mais à partir d'1/50, 1/100 l'agglutination, si elle est positive, peut être considérée comme spécifique et probante. Dans les cas aigus, pendant les premiers jours de la maladie, le pouvoir agglutinant du sérum du malade peut manquer et alors il sera bon d'isoler des fécès du malade l'agent étiologique. L'on pourra même tenter d'isoler cet agent du sang, mais on doit remarquer qu'on n'oblient qu'exceptionnellement des résultats positifs.

Pour la recherche des B. méta-dysentériques dans les fécès, on doit suivre les règles générales dictées par l'expérience et qui se sont montrées nécessaires pour isoler les B. dysentériques, le B. d'Eberth, etc. Il faut, en somme, pratiquer l'isolement des fécès aussitôt qu'elles ont été émises, et frotter les flocons de mucus éventuellement présents, sur des plaques, après un lavage préalable en solution physiologique stérile, ou bien diluer opportunément, dans de la solution physiologique ou dans de l'eau peptonée stériles, une oese de fèces et préparer les frottis sur plaques, à partir des diluitions à 1/100, 1/1000.

Il n'existe pas de véritables milieux d'enrichissement, ni même de milieux soi-disant électifs, du type Endo, Drigalski et Conradi, Mac Conkey, etc., qui ne présentent pas d'avantages particuliers en comparaison de la simple gélose lactosée (1%) et tournesolée.

Pour ce qui concerne l'aspect des colonies, si l'on veut adopter la terminologie d'Arkwright, elles présentent, pour la plupart, les caractéristiques du type *S*, c'est-à-dire qu'elles sont plates, rondes, aux bords réguliers et à la surface lisse, translucides, et c'est seulement après quelque temps et par des repiquages successifs qu'elles peuvent présenter les caractères qui sont propres au type *R*, savoir: le bord irrégulier, déchiqueté, et la surface rugueuse. Mais l'aspect des colonies n'est pas une donnée suffisante aux fins de diagnostic. Il est bien plus important de retenir le fait que les B. méta-dysentériques étant aptes à fermenter le lactose, acidifient les milieux lactosés, en virant les indicateurs d'acidité éventuellement présents. Si, par ex., on emploie le tournesol, le milieu devient rouge, mais pas d'une façon aussi prononcée — surtout pendant les 24 premières heures de développement — que pour le *B. coli*.

Le milieu qui est le mieux approprié pour différencier les B. métadysentériques du B. coli, est la gélose Levine (gélose nutritive 100 gr. – lactose 1 gr. – bleu de méthylène à 0,5% = 2 cmc. – éosine à 2% =

2 cmc.), car ici les colonies du *B. coli* se présentent fortement colorées en bleu, avec des reflets métalliques, tandis que les colonies des B. méta-dysentériques demeurent incolores, translucides. Il est donc bon de faire, ces essais d'isolement en double série, en employant des plaques de gélose lactosée tournesolée et de gélose Levine.

On examine les colonies suspectes, transplantées en bouillon, au point de vue morphologique, des caractères de coloration (Gram) et de la motilité. Les B. méta-dysentériques sont des bacilles relativement courts, Gram-négatif, asporogènes, immobiles. On fait successivement des ensemencements en gélose, eau-peptonée lactosée et lait tournesolé. Vingt-quatre heures après l'ensemencement, on fait l'essai de l'agglutinabilité des colonies isolées et cultivées sur gélose, vis-à-vis du sérum du malade et des sérums immuns obtenus des deux types principaux des B. méta-dysentériques (*Cast. castellanii – Cast. cast. var. kruse-castellani*).

Au bout de 48 heures, on détermine la concentration des ions-hydrogène dans les cultures en eau peptonée lactosée. Cette donnée est très importante et elle permet de s'orienter assurément dans le diagnostic des espèces de B. méta-dysentériques. Effectivement, on a pu constater (Cerruti, Bettazzi) que les deux types principaux des B. méta-dysentériques exercent une action fermentative d'intensité différente, aux dépens du lactose. En étudiant systématiquement le degré de concentration finale des ions-hydrogéne des cultures de B. méta-dysentérique dans les milieux liquides lactosés, on a constaté que le type *Cas. castellanii* atteignait rapidement une concentration finale égale à pH 5,3-5,2, tandis que la variété *Kruse-castellanii* oscillait autour de pH 6,8-6,4. En employant comme indicateur le rouge de bromo-crésol à pH 5,2-6,8, on obtient une coloration jaune avec les cultures de *Cast. castellanii* et une teinte violette avec celles de la variété *Kruse-castellanii*, déjà au bout de 48 heures seulement de développement dans l'eau peptonée lactosée. Nous avons ici une épreuve simple et rapide, semblable à celle qui est dénommée épreuve du rouge de méthyle, qui établit une différentiation analogue entre le *B. coli* et le *B. (lactis) aerogenes*.

L'examen des cultures en lait tournesolé exige une période d'observation plus longue (8 à 10 jours) et on ne peut pas toujours constater des différences évidentes dans la manière de se comporter de chaque type de B. méta-dysentériques. D'habitude, l'espèce *Cast. castellanii* acidifie et coagule le lait plus rapidement que la variété *Kruse-castellanii*.

De tout ce qui précède, il ressort que le diagnostic d'infection par le B. méta-dysentériques peut être posé avec certitude en se basant sur le résultat positif de l'épreuve d'agglutination, pratiquée avec le sérum du malade sur les deux types principaux de B. méta-dysentériques. Si

cette épreuve vient à manquer, il faut pratiquer l'isolement de l'agent étiologique des fécès du malade. Cette recherche n'est pas facile et dans plusieurs cas, surtout s'il s'agit de cas chroniques, il faut la répéter plusieurs fois avant d'atteindre le but. Il est mieux de se servir de plaques de gélose lactosée et tournesolée et de gélose Levine, en pratiquant les frottis suivant les mêmes modalités et les mêmes règles qui servent pour l'isolement du B. d'Eberth, et des B. dysentériques. Il est possible d'identifier les colonies suspectes sur simple examen des frottis, des résultats des épreuves d'agglutination vis-à-vis du sérum du malade et des sérums immuns obtenus de souches authentiques de B. métadysentériques, et enfin en se basant sur la façon dont se comporte le germe dans l'eau-peptonée lactosée et dans le lait tournesolé.

PUGNANI E. – **Tentatives de dissociation d'une souche de " bacterium coli ".**

(Communication présentée au IVe Congrès Italien de Microbiologie, de Milan).

L'on sait très bien que la dissociation microbienne peut apparaître tantôt spontanément, tantôt au moyen d'artifices particuliers par lesquels on met, généralement, le germe à l'examen dans des conditions plutôt défavorables à son existence et à sa réproduction.

Parmi les moyens vraiment très nombreux dont l'on se sert pour atteindre ce but, on emploie, avant tout, les passages par inoculation aux animaux, l'apauvrissement des milieux de culture de toute substance apte à favoriser le développement des germes, l'addition aux milieux mêmes de substances toxiques, antiseptiques ou colorantes, et surtout le contact avec des sérums ou des sangs immuns.

J'ai tâché de dissocier une souche de « *bact. coli communis* » récemment isolé de l'urine d'un sujet atteint de cystite, en employant les méthodes suivantes: les passages successifs par les organes du cobaye, soit *in vivo*, soit *in vitro*, les repiquages successifs sur milieu au vert de malachite et les repiquages en séries sur des milieux solides et liquides additionnés d'immun-sérum.

Voici, en résumé, les résultats que j'ai obtenus:

1°) *Passages successifs par foie de cobaye, soit « in vivo », soit « in vitro »*. – Les repiquages exécutés ont été de 40 pour chaque série: les germes, inoculés à différentes reprises sur plaques de gélose ordinaire, n'ont jamais donné lieu à la formation de colonies *R*, ce qui, d'ailleurs, était bien naturel si l'on considère le fait que les germes ont constamment

augmenté de virulence à mesure que l'on faisait les repiquages; j'ai observé pourtant, quelques modifications morphologiques des germes isolés qui, de courts batônnet de 2-3 μ de longueur, sont devenus, après 15-20 repiquages, des bactéries grosses, lourdes, parfois capsulées, 2 à 4 fois plus grandes que les germes originaux, et légèrement modifiées par rapport à leur aptitude à prendre le Gram. Ces variations ont été pourtant très fugaces, et elles ont disparu après un ou deux passages sur gélose ordinaire.

2°) *Passages sur milieu au vert de malachite.* – Résultat négatif.

3°) *Passages sur bouillon et gélose ordinaire, additionnés d'immun-sérum.* – J'ai obtenu l'immun-sérum en inoculant des lapins, à différentes reprises, avec la souche examinée. Le sérum ainsi obtenu, ayant un taux agglutinant de 1: 3200, a été additionné aux milieux culturaux dans la proportion de 20%.

Au bout de 35 passages successifs, je n'ai pas pu mettre en évidence de différence morphologique nette entre les colonies de la souche de départ, et celles provenant des derniers repiquages. Cependant, en gardant les cultures à l'étuve pendant environ vingt jours, j'ai pu remarquer dans quelques uns des derniers tubes à essai (32e-33e repiquage) la présence de colonies secondaires s'étant développées sur l'enduit bactérien primitif et caractérisées par leurs bords assez découpés et par une surface légèrement rugueuse qui, étant plane vers la périphérie de la colonie, se relevait en papille vers le centre de la colonie même.

J'estime que ces colonies peuvent être considérées comme des formes de passage de la variante *S* à la variante *R*, n'ayant pas encore tous les caractères de cette dernière.

En résumé, tandis que par les passages successifs sur les organes et sur des milieux au vert de malachite je n'ai pas réussi à obtenir la dissociation du germe examiné, par les passages sur gélose additionnée d'immun-sérum, j'ai pu constater la formation de colonies qui présentaient quelques caractéristiques de la variante *R*.

Je n'ai remarqué dans aucun cas de différences biologiques essentielles entre la souche de départ et celle obtenue en fin d'expérience.

TROSSARELLI L. – **Observations expérimentales sur la dissociation du " bacterium pyocyaneum ".**

(Communication présentée au IVe Congrès Italien de Microbiologie, de Milan.

L'A. a exécuté des recherches sur la dissociation du « bactérium pyoc aneum » par ensemencements du bacille même sur gélose additionnée d'immun-sérum homologue, au taux de 10%.

Il a pu constater qu'en faisant pendant 10 jours un repiquage quotidien sur gélose additionnée d'immun-sérum homologue (sérum obtenu, au bout d'environ un mois, en traitant des lapins par des injections répétées d'émulsion du germe) on déterminait la dissociation des formes *R* et *P*. Par contre, si l'A. cessait de faire les repiquages quotidiens sur gélose à l'immun-sérum, il remarquait la réversion dans la forme *S*. C'est seulement après avoir fait pendant quatre mois, les repiquages sur gélose additionnée de l'immun-sérum correspondant qu'il est parvenu à obtenir les formes *R* et *P* stables, de façon que, depuis deux mois environs, même en la repiquant seulement sur gélose simple, il a pu la conserver.

La variété *S* a présenté de petites colonies, régulièrement arrondies, pointues, lisses, et brillantes, à aspect homogène, et bien teintées en vert foncé.

La variété *R* a présenté des colonies larges, à bords relevés et ondulés, avec une zone centrale lisse, dont on voit partir des saillies, telles des marbrures, qui prennent l'aspect d'une montagne de glace, à couleur vert-clair.

La variété *P*, enfin, a présenté des colonies larges, incolores, ayant le bord relevé, et visibles seulement à la lumière réfléchie; quinze jours après l'ensemencement, au lieu de la colonie, on ne voit qu'une ombre.

Pour ce qui en est de la coloration des colonies, l'A. a observé qu'à partir d'une culture normale de « bacterium pyocyaneum » l'on obtient des colonies — du type *S*, *R* ou P — qui, après un certain laps de temps, perdent leur teinte bleue caractéristique et, peu à peu, arrivent jusqu'à la phase d'un germe fluorescogénique, mais non plus pyocyanogénique. Il a observé aussi que lorsqu'en partant de cultures âgées de quelques jours, il faisait, à intervalles différents, pendant l'évolution des modifications, une suspension en bouillon, 99% des germes présents dans les cultures de date récente, étaient encore aptes à produire une colonie bleu-verte abondante. Par contre, dans les cultures plus anciennes, il y avait formation de colonies identiques par leur forme aux premières, mais donnant une quantité très faible de pyocyanine et, parfois, même totalement dépourvues de coloration.

La variation de ces caractères biochimiques comporte non pas une perte légère du pouvoir pyocyanogénique de la part de tous les germes présents, mais l'apparition d'un type nouveau de microrganisme qui ne serait plus pyocyanogénique; de sorte qu'une accentuation de cette transformation peut amener l'exclusion totale du type bleu normal.

L'A., observant les cultures qui avaient été dissociées pendant plus d'une année, a vu qu'aucune d'elles ne montrait une tendance à produire les moindres traces de pyocyanine, décelable à l'épreuve du chloroforme.

S'il est possible de réveiller dans une vieille culture de « bacterium pyocyaneum » la production de la pyocyanine, cela dépend de la régénération de quelques microrganismes, qui ont survécu après le développement envahissant de colonies non pyocyanogénétiques. Mais lorsque la culture est stabilisée sur cette mutation, elle a perdu les derniers germes pyocyanogéniques; d'après ces expériences, le caractère chromogène perdu ne peut plus être acquis à nouveau.

NOSOTTI NADYA – **Sur la variabilité du Bac. de Shiga, cultivé en présence de l'immun-sérum.**

(Communication présentée au IVe Congrès Italien de Microbiologie, de Milan).

On sait qu'une souche de B. typhique cultivée en bouillon additionné de sérum agglutinant à un titre élevé, devient, après un certain nombre de passages, hypoagglutinable tout d'abord, et ensuite inagglutinable.

M. Lusena à démontré que les cultures en bouillon additionné d'immun sérum de différentes souches de B. typhique, devenues séro-résistantes, perdaient presque toujours leur aspect originaire; elles se montraient plus vigoureuses, et leur surface se recouvrait, très vite d'une couche épaisse pareille à celle que les autres bactéries, ou même les bacilles du typhus, forment, mais au bout de plusieurs jours seulement; enfin, après avoir essayé comment se comportaient ces cultures sur milieu au rouge neutre Rothberger, l'A. avait observé une formation de gaz et une décoloration, en remarquant en même temps une sensibilité très marquée des B. typhiques ainsi modifiés, vis-à-vis d'un sérum anti-paratyphique B.

Toute cause d'erreur éliminée, grâce à une technique très stricte et aux confirmations apportées par d'autres expériences, l'A. admettait que le traitement de la culture du B. typhique par l'immun-sérum, donnait lieu à une souche de paratyphique B. Il affirmait que la sérum-résistance était de très longue durée; qu'on pouvait l'obtenir d'autant plus assuré-

ment que le sérum employé était plus actif, et enfin que l'agglutination des paratyphiques dérivés du typhique était plus rapide que celle des souches de contrôle.

Sur le conseil de M. le Prof. Zironi, j'ai poursuivi ces recherches et les ai, dans les Laboratoires de cet Institut, étendues au bacille de Shiga.

La technique que j'ai suivi pour mes expériences est très voisine de celle qui fut déjà appliquée par M. Lusena dans ses recherches. Dans des tubes contenant 10 cmc. de bouillon stérilisé j'ajoutai deux gouttes de sérum agglutinant et pour en contrôler la parfaite stérilité, je gardai les milieux à l'étuve 48 heures.

Les souches à l'examen provenaient de cultures unicellulaires préparées, d'après la méthode de Burri, par M. le Dr. Paoli. À partir de cultures sur gélose inclinée, je commençai les repiquages en bouillon additionné de sérum et je les continuai de 24 en 24 heures. J'ai toujours eu soin d'avoir à ma disposition des tubes de contrôle en bouillon ordinaire, que j'ensemençai par des passages numérotés, parallèlement aux contrôles en immun-sérum, dans le but de voir si les ensemencements en bouillon répétés pouvaient déterminer, eux aussi, des modifications dans les souches.

Au début des épreuves avec le Shiga I° de provenance unicellulaire, on a vérifié ses caractères culturaux, biologiques, sérologiques. Il était immobile, ne coagulait pas le lait, ne dégageait pas de gaz lorsqu'il était cultivé en gélose glucosée; sur la gélose inclinée, il donnait lieu à des colonies petites, transparentes, délicates, typiques; il fermentait, avec production d'acide, le glucose, le galactose, le lévulose, en laissant intact le maltose, le lactose, le saccharose, et la mannite.

Avec le sérum agglutinant 1:100, il agglutinait presque jusqu'au titre de 1/900.

Lorsque le bacille en question était ensemencé en bouillon additionné de sérum, suivant la technique exposée, il agglutinait lors des premiers passages en gros flocons, laissant après agitation le bouillon limpide; celui-ci demeurait tel, même après plusieurs jours, puis, lors du 6ème, 7ème passage le bacille commençait seulement à le troubler légèrement, et enfin il donnait des suspension homogènes aux repiquages successifs.

La diminution de l'aptitude d'agglutiner de la part du germe vis-à-vis de son immun-sérum, n'apparaît pas brusquement, mais plutôt graduellement, quoique sans lenteur. Si sur les axes d'un graphique je représente en ordonnée les dilutions du sérum agglutinant, et en l'abscisse les passages en bouillon sérumisé correspondant au 3e-6e-9e-12e-15e passage, j'ai une ligne qui atteint la hauteur *maximum* de l'ordonnée au 3e passage, avec une agglutination jusqu'au 1/1000, et qui baisse rapidement jusqu'à rejoindre l'abscisse, au 12ème passage en milieu au sérum.

Après avoir constaté la perte du pouvoir agglutinant pour la souche

du bacille de Shiga traitée de la sorte, j'ai voulu voir si, en modifiant ses propriétés sérologiques spécifiques, elle acquérait d'autres propriétés vis-à-vis des immun-sérums hétérogènes, ainsi qu'il était arrivé à M. Lusena au cours de ses expériences sur le B. typhique. En répétant alors les épreuves mentionnées ci-dessus, je prélévai de chaque passage en bouillon additionné d'immun-sérum anti-shiga, une oese, que j'ensemençai dans d'autres tubes contenant 10 cmc. de bouillon sérumisé à l'aide de deux gouttes de sérum agglutinant le bacille de Flexner, et en d'autres encore qui avaient été sérumisés avec deux gouttes de sérum agglutinant le bacille d'Eberth. C'est avec surprise que j'ai constaté que dans les tubes sérumisés à l'aide du sérum agglutinant le B. typhique et ensemencées en prélevant une oese de culture du 6ème, 7ème passage en bouillon + immun-sérum anti-shiga, il y avait une floculation évidente.

Cette floculation se faisait de plus en plus stable, en laissant le bouillon d'autant plus limpide, que le nombre de passages, était plus élevé; de cette manière, à partir de la 15ème sérumisation de la souche étudiée (en suspension homogène troublant le milieu), pour troubler en repiquant en bouillon + sérum anti-typhique, j'obtenais une suspension agglutinée dans un liquide presque limpide.

En représentant, ici, sur l'ordonnée d'un graphique, les différentes dilution du sérum agglutinant le B. typhique et sur l'abscisse les cultures de Shiga dérivées du 3e-6e-9-$^{e}12^{e}$-15e passage en bouillon + immun-sérum spécifique, on obtient une courbe qui atteint le point le plus élevé de l'ordonnée au point correspondant à la 15ème sérumisation et dont les germes sont agglutinés par le sérum anti-typhique (titre 1/25.000) jusqu'à 1: 2000.

Dans les tubes sérumisés avec du sérum anti-Flexner, les ensemencements faits à partir des passages déjà examinés, n'ont donné rien de particulier.

Les caractères culturaux étudiés lors de la 9ème, 13ème, 15ème sérumisation ont présenté des modifications marquées, en comparaison des caractères propres à la souche normale; lors de la 9ème sérumisation ils ont montré une modification en bouillon ordinaire, se manifestant par l'apparition d'un voile en surface.

Les cultures par frottis qui demeuraient encore transparentes et minces lors du 4ème et du 5ème passage, sont maintenant devenues épaisses, opaques, et envahissent le milieu de culture dans les sérumisations successives.

J'ai étudié aussi l'action du B. Shiga sérumisé sur les sucres et la toxicité du germe modifié, en comparaison du germe normal.

Après avoir préparé des cultures sur gélose à partir des 3e-6e-9e-12e-15e passages en bouillon + immun-sérum, j'ensemencai autant séries

de sucres, parmi lesquels j'ai rangé ceux qui, sont généralement employés pour les réactions diagnostiques, et précisément: le lévulose, la mannite, le galactose, le lactose, le glucose, le maltose. Rien n'est à signaler pour ce qui se rapporte aux ensemencements faits des cultures dérivées du 3ème et du 6ème passage; ainsi que la souche originaire, ils acidifiaient au bout de 24 heures, le glucose, le galactose, le lévulose, en laissant intact le maltose, le lactose, le saccharose, et la mannite. Par contre, dans les ensemencements faits a partir du 9ème passage, la mannite et le maltose commençaient à virer, pour devenir nettement acides dans les séries ensemencées à partir de la 12ème et de la 15ème sérumisation.

	Souche normale	Souche à la 15ème sérumisation
Glucose	acide	acide
Galactose	acide	acide
Lévulose	acide	acide
Maltose	inaltéré	acide
Lactose	inaltéré	inaltéré
Saccharose	inaltéré	inaltéré
Mannite	inaltéré	acide

Les épreuves dont j'ai parlé plus haut ont été répétées plusieurs fois, avec les souches provenant des cultures en bouillon additionné de sérum, même après les avoir plusieurs fois ensemencées sur gélose inclinée, pour l'isolement des colonies. Les résultats ont été toujours concordants.

Quant à la toxicité du germe, j'ai pu faire aussi des observations intéressantes. J'ensemençais quelques petits ballons stériles contenant 100 cmc. de bouillon, avec des germes provenant de la souche originaire et quelques autres avec des germes modifiés à partir de la 15ème sérumisation du bouillon.

Je les ai gardés huit jours à l'étuve, après quoi je procédais à la préparation de la toxine par filtration (toxine normale, toxine 15ème passage).

J'inoculais les deux toxines à deux rats albinos, à partir de ½ cmc. du filtrat. La dose *minima* mortelle pour la souche normale était d'un cmc.; mais j'ai constaté que même après une injection de 7 cmc. de toxine 15ème passage (la dose la plus forte qu'il m'était possible d'inoculer, étant donné les petites dimensions de l'animal) les rats ne succombaient pas.

Le Shiga II — (une autre souche de provenance unicellulaire, que j'ai voulu expérimenter) — était normal au point de vue bactériologique et sérologique et je l'ai traité dans les mêmes conditions que le bacille précédent. Il commençait à se montrer hypoagglutinable au 8ème passage en bouillon sérumisé, et lors du 17ème passage il donnait une

suspension uniformement trouble. Parallèlement à la disparition de la propriété agglutinante spécifique, on voyait apparaître la propriété agglutinante vis-à-vis du sérum anti-typhique. Même ici, la fermentation des sucres se modifiait à partir de la 9ème sérumisation, donnant l'acidification de la mannite, mais, à la différence de la souche modifiée du Shiga I, celle du Shiga II n'a pas déterminé l'acidification du maltose.

Résumé. — Deux souches du bacille de Shiga, de provenance unicellulaire, cultivées en bouillon additionné de sérum agglutinant spécifique, sont devenues, après plusieurs passages, inagglutinables. Simultanément à la perte de l'agglutinabilité spécifique, on a constaté graduellement l'aptitude du germe à agglutiner avec l'immun-sérum anti-typhique.

On a de même observé des modifications dans l'action fermentative vis-à-vis des sucres, la souche Shiga I ayant acquis l'aptitude d'acidifier le maltose et la mannite, et la souche Shiga II celle d'acidifier la mannite.

En étudiant le pouvoir toxique de la souche Shiga I modifiée lors de la 15ème sérumisation, par injections du filtrat de culture en bouillon à des rats albinos, on a constaté dans cette souche modifiée le manque de toxicité, tandis qu'avec le filtrat de la souche originaire la dose *minima* mortelle était d'un centimètre cube.

Institut Sérothérapique de Milan.

Direttore responsabile: Dr. Prof. A. Zironi.